

THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Recherche de marqueurs moléculaires pour le génotypage et l'étude épidémiologique de souches européennes de Leishmania

Botilde, Yanick

Award date:
2004

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.



FACULTES UNIVERSITAIRES NOTRE-DAME DE LA PAIX
NAMUR

Faculté des Sciences

**RECHERCHE DE MARQUEURS MOLECULAIRES POUR LE GENOTYPAGE ET
L'ETUDE EPIDEMIOLOGIQUE DE SOUCHES EUROPEENNES DE *LEISHMANIA***

**Mémoire présenté pour l'obtention du grade de
licencié en Sciences biologiques**

Yanick BOTILDE

Juin 2004

Au terme de ce travail, je tiens à remercier les personnes qui ont contribué de près ou de loin à sa bonne réalisation.

Je tiens tout d'abord à remercier M. Xavier De Bolle qui a accepté de promouvoir ce mémoire.

Je souhaite aussi remercier Jean-Claude Dujardin pour m'avoir suivi pendant ces quelques mois parmi les « Leishmaniaques » et m'avoir aidé à garder confiance en l'avancement du travail par son enthousiasme toujours communicatif (et j'en avais bien besoin par moments).

Je remercie également Wilber Quispe, pour sa disponibilité, ses explications pratiques et réponses à mes questions et doutes ; ainsi que toute la Team Péruvienne pour la bonne ambiance et m'avoir fait découvrir un peu de leur gastronomie (Aaah... ces fins de journées Pisco-Ceviche !)

Je voudrais aussi remercier toutes les personnes qui m'ont aidé pour les situations aussi variées que : conseils techniques, traduction des titres des quotidiens, explications de l'organisation et du fonctionnement de l'institut, problèmes informatiques, entretien de la machine à café, manque de réactifs, badge oublié du mauvais côté de la porte, avis critiques sur les résultats, recherche de mon tuteur mystérieusement porté disparu pendant les temps de midi, ...

Je n'oublie pas ceux qui sont restés à Namur : Merci à tous pour les bons (et parfois moins bons) moments passés durant ces 4 ans : les délires en bauchau, guindailles, mais aussi les sessions, exams, ...

Enfin, je tiens également à remercier toute ma famille qui m'a toujours soutenu et encouragé lors des moments difficiles : Papa, Maman, Sandy, Marine, Mamy, Manick, Christian, Quentin, Manon, ...

Table des matières.

Liste des abréviations.....	iii
I. Introduction	1
1. Le parasite.....	1
A. Classification.....	1
B. Biologie.....	1
C. Cycle.....	2
D. Taxonomie.....	3
D.1. Problèmes de détermination.....	3
D.2. Classification.....	4
D.3. Le complexe <i>L. donovani</i>	5
D.3.1. <i>Leishmania infantum</i>	5
D.3.2. <i>Leishmania donovani</i>	5
D.3.3. <i>Leishmania chagasi</i>	5
D.3.4. <i>Leishmania archibaldi</i>	5
E. Méthodes d'identifications.....	6
E.1. La MLEE.....	6
E.2. La PCR-RFLP.....	7
E.3. La RAPD.....	7
F. Phylogénie.....	7
2. La maladie.....	8
A. Pathogenèse-Immunologie-Aspects cliniques.....	8
A.1. Infection sub-clinique.....	8
A.2. Leishmaniose cutanée.....	8
A.3. Leishmaniose muco-cutanée.....	9
A.4. Leishmaniose viscérale.....	9
A.5. Infections animales.....	10
B. Antigènes et variabilité antigénique.....	10
B.1. La GP63 : Fonctions et organisation génomique.....	10
B.2. La CPB : Fonctions et organisation génomique.....	11
C. Diagnostic.....	12
C.1. Diagnostic parasitologique.....	12
C.2. Diagnostic sérologique.....	12
C.3. Autres méthodes.....	13
D. Traitements.....	13
D.1. Les dérivés stibiés.....	13
D.2. L'amphotéricine B.....	13
D.3. La miltefosine.....	13
D.4. Autres agents anti-Leishmaniens.....	14
D.5. Modes de traitements.....	14
E. Association avec le SIDA.....	14
3. Epidémiologie.....	15
A. Transmission.....	15
A.1. Transmissions naturelles.....	15
A.2. Transmission à l'aide d'un vecteur artificiel.....	16
B. Programmes de contrôle.....	16
4. <i>Leishmania infantum</i> en Espagne.....	17
5. Hypothèses et objectifs du mémoire.....	18

II.	Matériel et méthodes.....	19
1.	Souches de <i>Leishmania</i>	19
2.	PCR-RFLP.....	19
A.	Amplification de la séquence intragénique de GP63.....	21
B.	Amplification de la séquence intragénique de CPB.....	21
C.	Amplification de la séquence intergénique de CPB.....	21
D.	Première précipitation à l'alcool.....	22
E.	Restrictions enzymatiques.....	22
3.	RAPD.....	23
4.	Mesure de la concentration d'ADN par spectrophotométrie.....	23
5.	Analyse des données.....	24
III.	Résultats.....	26
1.	Souches utilisées.....	26
2.	PCR-RFLP.....	26
A.	PCR-RFLP utilisées.....	26
B.	Analyse des résultats.....	27
B.1.	Restriction de la séquence de la GP63.....	27
B.2.	Restriction de la séquence intragénique de la CPB.....	27
B.3.	Restriction de la séquence intergénique de la CPB.....	28
C.	Analyse phénétique du polymorphisme observé.....	28
D.	Comparaison de polymorphisme des souches espagnoles avec d'autres souches du complexe <i>L. donovani</i>	29
3.	PCR-RFLP au niveau du kDNA.....	30
4.	RAPD.....	31
A.	Présentation et justification du choix de la technique.....	31
B.	Premières configurations et expérimentations.....	31
C.	Recherche des solutions.....	32
D.	Nouvelles mises au point.....	32
E.	Résultats.....	33
5.	Polymorphisme total.....	34
IV.	Conclusion et perspectives.....	36
V.	Bibliographie.....	39

Liste des abréviations.

°C : degrés centigrade
µl : microlitres
A : Adénine
Abs : Absorbance
ADN :acide désoxiribonucléique
ARN : acide ribonucléique
ATPase : Adenosine tri-phosphate hydrolase
C : Cytosine
CPB : Cystéine Protéinase B
CMH : Complexe Majeur d’Histocompatibilité
DAT : Direct Agglutination Test
DTU : Discrete Typing Unit
EDTA : acide éthylène diamine tétra acétique
ELISA : Enzyme-linked immunoabsorbent assay
Fig. : figure
G : Guanine
GL : Ganglions Lymphatiques
GP63 : Glycoprotéine 63
IL : Interleukine
Intra : intragénique
Inter : intergénique
ITG : Institut de médecine tropicale
kb : kilobase
kDNA : ADN kinétoplastique
LACK : *Leishmania* homologue of mammalian receptors for activated C kinase I
LC : Leishmaniose Cutanée
LPG : Lipophosphoglycan
LV : Leishmaniose Viscérale
M : Molaire
MLEE : Multilocus enzymes electrophoresis
MO : Moelle osseuse
mm : millimètre
NNN : Novy, mc Neil and Nicolle
P : Peau
pb : paires de base
PBS : Phosphate Buffer Saline
PCR : Polymerase Chain Reaction
pH : Potentiel Hydrogène
RAPD : Random Amplified Polymorphic DNA
RFLP : Restriction Fragment Length Polymorphism
SDS : Soduim Dodecyl Sulfate
SIDA : Syndrome d’Immuno-Déficiencce acquise
T : Thymine
TNF : Tumor Necrosis Factor
U : unité
UPGMA : Unweighted Pair Group Method using Arithmetic Averages
U.V. :Ultraviolet

V : Volts

VIH : Virus de l'Immunodéficience Humaine

I

Introduction

1. Le parasite.

A. Classification.

Règne: Protistes
Sous-Règne: Protozoaires
Embranchement: Sarcomastigophores
Sous-Embranchement: Mastigophora
Classe: Zoomastigophorea
Ordre: Kinetoplastida
Sous-Ordre: Trypanosomastina
Famille: Trypanosomatidae
Genre: *Leishmania*

B. Biologie

Leishmania, causant les différentes formes de leishmaniose sont des protozoaires parasites de vertébrés et d'invertébrés.

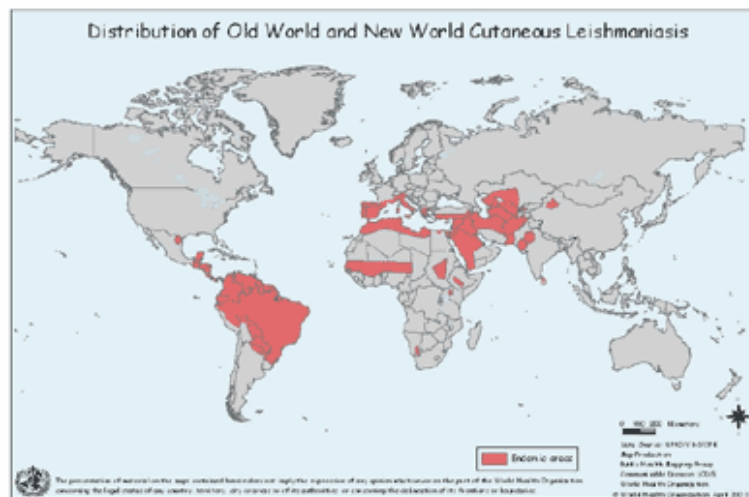
Elles sont présentes dans de nombreuses régions du monde (voir Fig. 1): Afrique, bassin méditerranéen, Moyen-Orient, Amérique du sud et centrale. Pour classer la répartition des espèces sur le globe, les différentes régions mondiales sont englobées dans deux grandes zones : l'Europe, l'Afrique, et l'Asie forment l'Ancien Monde, tandis que le continent Américain est appelé le Nouveau Monde.

Le protozoaire *Leishmania* possède deux formes spécifiques: promastigotes et amastigotes (voir Fig. 2).

La forme promastigote est trouvée dans le vecteur, le parasite sous cette forme a une longueur entre 5 et 20 μm et possède un long flagelle à l'extrémité antérieure, à la base duquel se trouve le kinétoplaste. Cette forme est adaptée à la vie extracellulaire et aux conditions dans le tube digestif de l'hôte: température ambiante (souvent proche de 25°C), pH neutre. L'hôte de cette forme est un invertébré ayant un rôle actif dans la transmission du parasite aux hôtes vertébrés (d'où son nom de vecteur). Cet hôte est un petit diptère nématocère hématophage (3-4 mm) appartenant à la sous-famille des phlebotominae, aux genres *Phlebotomus* (Ancien monde) et *Lutzomyia* (Nouveau monde) (Voir Fig. 3). Sur les 700 espèces connues, seulement 30 sont des vecteurs prouvés de la leishmaniose (plus 46 supposés) (Killick-Kendrick, 2002). Ces phlébotomes sont largement présents à travers le monde, mais chaque espèce est plus spécifique à un milieu (savane, forêts), et restreinte à son environnement par deux paramètres : la température (surtout pour les espèces tempérées) et les précipitations (surtout pour les espèces tropicales). Les phlébotomes se nourrissent de nectar, de fruits et de sucs de pucerons. Seules les femelles sont hématophages, elles ont besoin de protéines sanguines pour le développement de leurs œufs. Les repas sanguins ont généralement lieu le soir, quand la température n'est pas trop élevée (environ 20°C) et que le vent est faible (le phlébotome vole trop mal pour supporter les turbulences).

La forme amastigote est sphérique, d'un diamètre de 3 μm ; elle possède toujours un flagelle mais celui-ci est réduit à sa plus simple expression, car d'aucune utilité chez un parasite intracellulaire. Tout comme le promastigote, cette forme est adaptée aux exigences de son environnement: le phagolysosome des macrophages des vertébrés (37°C, pH= 4,5).

A.



B.

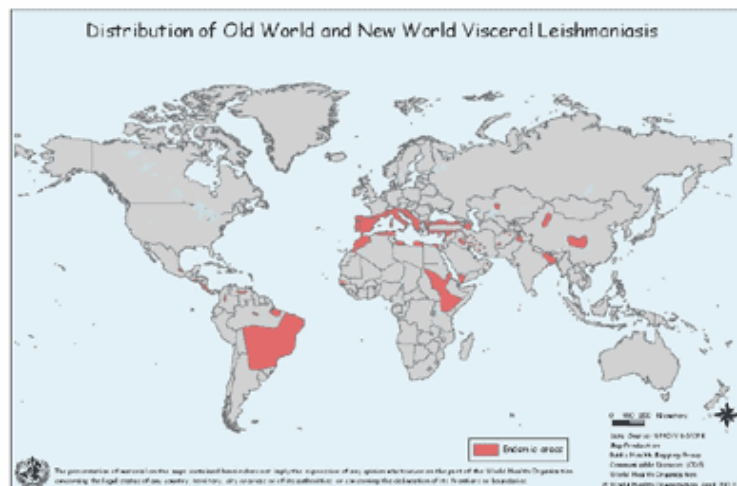


Fig.1 : Répartition mondiale de la leishmaniose (A) cutanée et (B) viscérale (Source :site internet de l’OMS : <http://www.who.int>).

A.



B.

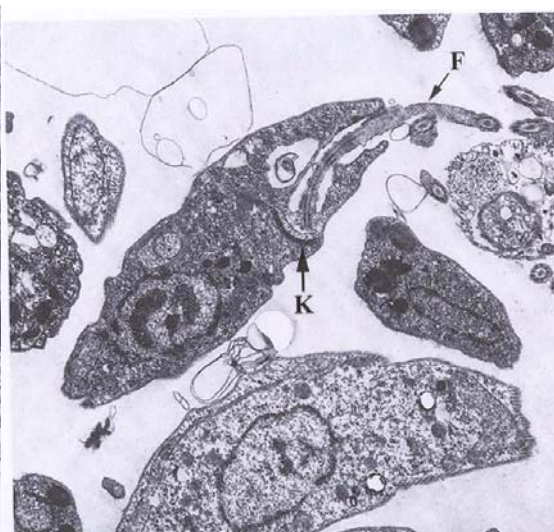


Fig. 2 : Microscopie de *L. donovani*, sous forme amastigote (A) et promastigote (B).
N : Noyau ; K : Kinétoplaste ; F : Flagelle. Ref : CD-Rom Leishmaniasis, *the wellcome Trust*.

Comme tous les eucaryotes, *Leishmania* possède un noyau, des organites classiques des protozoaires (une seule mitochondrie, flagelle) et un système membranaire (réticulum endoplasmique, golgi, lysosomes). Elles possèdent aussi un organite spécifique de l'ordre des Kinetoplastida: le kinétoplaste. C'est dans cette structure qu'est stocké et condensé entre autres l'ADN mitochondrial, sous deux formes caractéristiques: les maxi et mini-cercles. Les maxi-cercles (10-30/Cellule, 20-40 kb) contiennent l'ADN mitochondrial, qui code pour la chaîne de transport d'électrons, les ribosomes mitochondriaux. Les mini-cercles, plus petits et plus nombreux (1000-10.000/Cellule, inférieurs à 1 kb), codent les ARN guides qui vont intervenir dans l'édition des ARN messagers mitochondriaux, en insérant ou déléant des dérivés uridine sur la séquence. Les leishmanies possèdent également des glycosomes, petites vésicules où sont centralisées les réactions métaboliques de la glycolyse.

Le génome de *Leishmania* est divisé en deux grandes catégories: l'ADN nucléaire et l'ADN kinétoplastique. L'expression génique chez *Leishmania* est particulière, elle diffère assez de celle des autres eucaryotes. D'abord, les gènes ne comportent pas d'introns et sont fréquemment arrangés en tandems (répétitions). Les messagers transcrits sont polycistroniques, et la transcription est complète et continue: *Leishmania* transcrit la totalité de son génome non-stop, il n'y a pas de régulation à l'initiation de la transcription. La régulation de l'expression se fait essentiellement à un niveau post-transcriptionnel.

C. Cycle

Le cycle commence quand un phlébotome infecté vient prendre un repas sanguin chez un vertébré. Avant d'absorber le sang, l'insecte injecte sa propre salive, d'une part parce qu'elle contient des agents fluidifiants et vasodilatateurs facilitant la prise de sang et d'autre part parce que les promastigotes s'accumulent au niveau du pharynx et gênent l'absorption. Il faut donc que le phlébotome les élimine avant de se nourrir, il les injecte dans l'hôte en même temps que sa salive.

Une fois dans le sang, les parasites, toujours sous forme promastigote, vont être la cible du système immunitaire: attaque du complément -qui facilite la reconnaissance par les macrophages et de toutes les cellules du système Réticulo-Endothélial- en se fixant sur les molécules de surface du parasite. L'interaction Complément/Récepteur membranaire du macrophage (entre autre) déclenche la phagocytose du parasite. Lorsqu'ils sont rentrés dans la cellule, les parasites résistent aux enzymes protéolytiques et attaques oxydantes venant de la fusion avec le lysosome, grâce à leurs protéines de surface: des hydrolases dégradant les enzymes lysosomiales (Glycoprotéine 63, cystéines protéases), des ATPases pompes à protons maintenant le pH interne entre 6,8 et 7,4. Ensuite les promastigotes métacycliques, c'est-à-dire ceux qui avaient déjà "préparé" les adaptations relatives au changement d'hôte dans le tube digestif du phlébotome, vont se différencier en forme amastigote (plus petite, sphérique, dépourvue de flagelle, bien adaptée à la vie intracellulaire et aux pH acides).

Ces formes amastigotes acidophiles vont se multiplier par mitose à l'intérieur du macrophage, stimulées par l'acidité du milieu, et mener à la lyse de la cellule immunitaire et à la libération de nombreux parasites amastigotes qui vont se refaire phagocyter et se multiplier dans leurs nouveaux hôtes cellulaires (voir fig. 4).

Le parasite est retransmis au vecteur lors d'un repas sanguin. Quand l'insecte prend un repas sanguin sur un hôte infecté, il absorbe les cellules infectées. L'insecte développe alors une membrane autour de ce repas sanguin: la membrane péritrophique. La digestion progressive des cellules ingérées va libérer les parasites amastigotes dans le tube digestif. C'est dans cette cavité que les parasites vont se différencier en promastigotes (extracellulaires, allongés et flagellés). Après une période de différenciation d'environ trois jours, les parasites

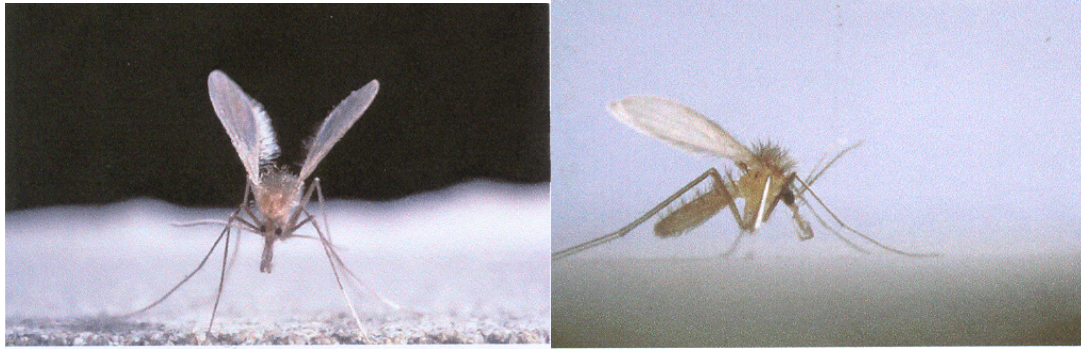


Fig. 3 : Le vecteur de la leishmaniose dans l'ancien monde: le phlébotome. Ref :Topics in international health, CD-ROM « Leishmaniasis »

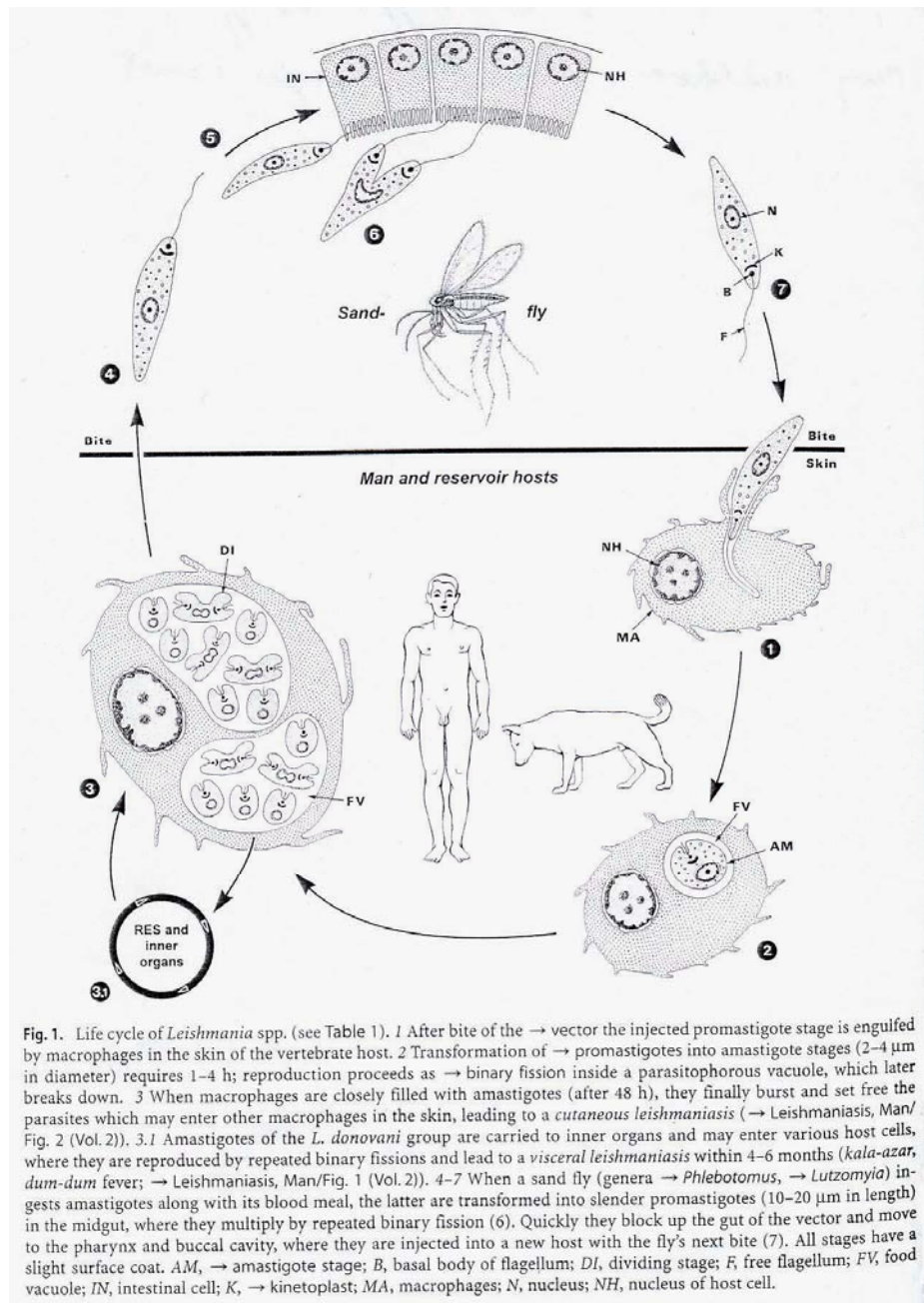


Fig. 4 : Cycle de développement du parasite. D'après H. Mehlhorn, (2001).

rompent la membrane péritrophique et envahissent l'ensemble du tube digestif. Ceux présents au niveau supérieur vont alors se fixer aux cellules via les interactions entre leur Lipo PhosphoGlycan (LPG), une macromolécule membranaire composée d'une coiffe, d'unités répétées de saccharides et d'un lipide l'ancrant dans la membrane plasmique (voir Fig. 5) (Chang et Chaudhuri, 1990). Ces parasites vont ensuite devenir métacycliques en préparation au changement d'hôte (Forme plus infectieuse, ne se divisant pas, prêt à survivre dans l'environnement de l'hôte vertébré). De plus, le temps nécessaire à ces métamorphoses et différenciations correspond à celui séparant deux repas sanguins du phlébotome (M.C. de Almeida *et al.*, 2003.). C'est le résultat de la co-évolution vecteur-parasite, et cette adaptation augmente encore le pouvoir d'infection des leishmanies.

D. Taxonomie.

D.1. Problèmes de détermination.

La détermination des *Leishmania* peut se faire selon des critères morphologiques jusqu'au genre. Pour l'identification et la taxonomie infra-générique, les critères morphologiques ne sont plus valables. En effet, les différentes espèces de *Leishmania* sont identiques si on les regarde au microscope, et ce pour les deux formes que le parasite peut prendre. Il a donc fallu trouver de nouveaux caractères permettant de rassembler et classifier les différentes populations observées.

Les premières classifications de *Leishmania* se sont faites autour de critères extrinsèques tels que la localisation géographique et les aspects cliniques liés à l'infection humaine (jusqu'en 1950). On peut rapprocher ce principe d'identification avec le concept morphologique d'espèce (ici les caractères sont des symptômes cliniques). De cette classification vient les noms des espèces : *L. braziliensis*, *L. peruviana*, *L. mexicana* (origine géographique), *L. chagasi* (Leishmaniose viscérale du nouveau monde), *L. infantum* (atteint les enfants et cause la leishmaniose viscérale dans le vieux monde), *L. donovani* (Leishmaniose viscérale du vieux monde) ou *L. major* (leishmaniose cutanée du vieux monde).

Mais cette classification devint vite obsolète en raison du plus grand nombre de caractères étudiés (comportements du parasite en culture, dans les hôtes, structure des molécules organiques, Peters, 1986) et de la complexité de la maladie (*L. infantum* peut générer une leishmaniose cutanée, *L. braziliensis* développe une leishmaniose muco-cutanée dans 10% des infections) et des migrations humaines, emmenant avec elles les parasites dans de nouveaux biotopes ou bien dans des zones endémiques d'autres espèces. Chercher à identifier les espèces de *Leishmania* d'après le concept biologique d'espèce (un groupe reproductivement isolé, échangeant du matériel génétique d'une génération à l'autre ; infertilité croisée) est difficile, car *Leishmania*, comme de nombreux protozoaires, se multiplie presque exclusivement de façon clonale, par mitose. Bien que des recombinaisons sexuelles peuvent occasionnellement se produire, c'est un phénomène relativement rare et n'influençant pas les structures des populations (K. Victoir et J.C. Dujardin, 2002).

Il faut donc chercher d'autres caractères permettant l'identification des espèces. Ces caractères sont des critères appelés intrinsèques (métabolisme, structure des protéines et du génome) qui permettent l'identification de l'espèce par la taxonomie numérique (définition d'une espèce au moyen de nombreux caractères, non hiérarchisés ; à l'opposé de la classification linnéenne). Les critères intrinsèques constituant aujourd'hui encore la référence en matière de classification des *Leishmania* sont les profils isoenzymatiques, qui permettent non seulement de définir les complexes et les espèces associées, mais également d'aller à un

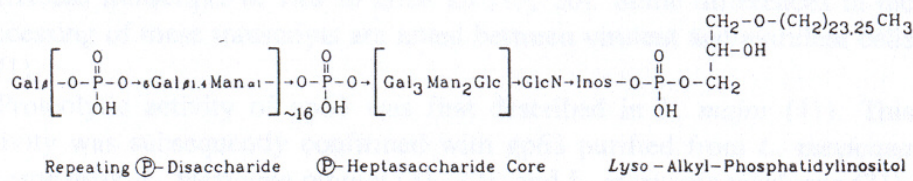


Figure 2 Structure of lipophosphoglycan from *Leishmania donovani*. Reproduced with permission from 165.

Fig. 5 : Structure du LPG. La molécule se compose d'une ancre GPI, permettant l'ancrage dans la membrane, un core d'heptasaccharides phosphorylés, et d'une coiffe de sucre phosphorylés, dont la structure varie selon l'espèce et la forme. Il intervient entre autre dans l'infection des macrophages, il facilite l'endocytose du parasite en étant reconnu par les récepteurs au complément. D'après Chang and Chaudhuri, 1990.

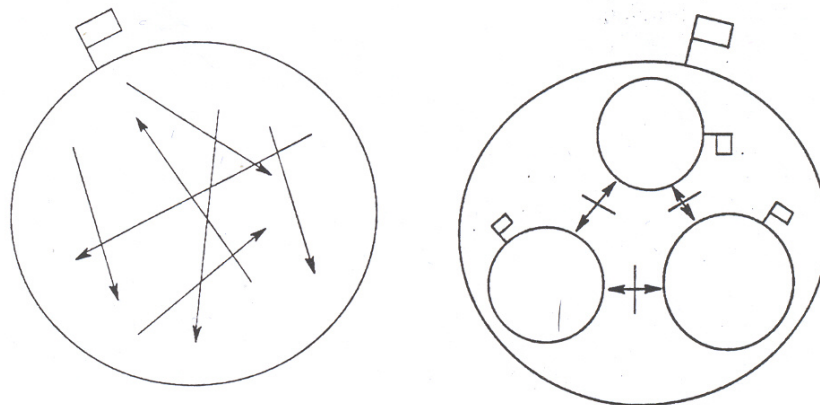


Fig. 1. Diagrammatic representation of nonstructured (left) vs structured (right) models of pathogen populations [6]. In the non-structured model, gene flow (symbolised by arrows) is frequent enough to prevent the maintenance of discrete genetic lines. The operational unit of research is the entire species only. On the contrary, in the structured model, the species is subdivided into discrete genetic entities between which gene exchange (symbolised by double arrows) is inhibited. In the two models, the species are supposed to correspond to discrete typing units or DTUs (see text), that can be specifically identified by convenient genetic markers or 'tags' (symbolised by small flags). In the structured model, the species is further subdivided into lesser DTUs, each characterized by specific 'tags'. These lesser DTUs can be taken as units of research as well as the whole species.

Fig. 6: Structure interne des populations pathogènes. Dans une population dites « non structurées » (une espèce au sens biologique du terme par exemple), les échanges de gènes sont fréquents et empêche la formation d'une structure interne. Dans une population structurée, les échanges génétiques sont absents ou réduits, ce qui conduit à une divergence des caractères chez les différentes sous populations, ces sous populations forment des DTUs. D'après Bañuls *et al.*, 1999.

niveau infragénérique de par la mise en évidence des zymodèmes (l'ensemble des souches présentant un profil identique pour plusieurs systèmes enzymatiques).

La taxonomie doit également rechercher des « discrete typing units » (DTUs), un groupe taxonomique facilement identifiable par un marqueur spécifique (génétique, moléculaire, immunologique) (M. Tibayrenc et F. Ayala, 2002.). La DTU peut être l'espèce étudiée, mais également des groupes internes à cette espèce. La présence d'une structure à l'intérieur d'une espèce (comme les DTUs ou les zymodèmes dans le cas de *Leishmania*) peut s'expliquer par la propagation clonale de cette espèce. En effet, chez une espèce à reproduction sexuée, le brassage de caractères causé par la recombinaison génétique empêche la formation de sous-groupes individualisés en-dessous de cette espèce. Par contre, chez les espèces à reproduction asexuée et propagation clonale (bactéries, protozoaires), les mutations s'accumulent dans les différentes populations de cette espèce et les divergences s'amplifient au cours du temps, dues à l'absence d'échange de caractères. Ainsi apparaît une structure à l'intérieur d'une espèce (A.L. Banuls *et al.*, 1999) (voir Fig.6). Cette structure peut être composée de DTUs si chaque groupe est identifiable par un marqueur spécifique, ou de clonets si tous les individus d'un groupe (d'une espèce à propagation clonale) sont génétiquement identiques (l'identité est montrée par une série de marqueurs génétiques) (M. Tibayrenc et F. Ayala, 2002).

Ces DTUs sont non seulement un outil taxonomique, mais possèdent également des applications cliniques : la variabilité génétique à l'intérieur d'une population (de protozoaires parasites) pourrait être corrélée à sa diversité biologique. Inscrit dans la diversité globale existe une diversité de caractères importants pour les cliniciens, telles que la pathogénicité ou les résistances aux substances employées dans les traitements (Tibayrenc, 1998). Il serait alors possible, par la mise au point de DTUs, de développer des marqueurs indirects spécifiques permettant de distinguer les souches résistantes et/ou plus virulentes à l'intérieur d'une population de parasites.

D.2. Classification.

La taxonomie actuelle divise le genre *Leishmania* en deux sous-genres : *Leishmania* et *Viannia*. Ces deux groupes se distinguent par leur localisation dans le tube digestif du vecteur : Les espèces du sous-genre *Leishmania*, également appelé suprapylaria, colonisent les sections antérieures et moyennes du tube digestif du phlébotome ; tandis que les espèces appartenant au sous-genre *Viannia*, synonyme de peripylaria, s'installent en plus dans la partie terminale du tube digestif (voir Fig. 7). La plupart des espèces de *Leishmania* appartiennent au sous-genre *Leishmania* : les espèces des complexes *L. donovani*, *L. tropica*, *L. major*, *L. mexicana*. Le sous-genre *Viannia* comprend des espèces du nouveau monde telles que celles des complexes *L. braziliensis* et *L. guyanensis* (Rioux *et al.*, 1990).

Remarque : le genre *Leishmania* ne comprend que les espèces de parasites infectant les mammifères ; les parasites kinétoplastidés de reptiles ont été regroupés dans un autre genre : *Sauroleishmania*.

Les différentes espèces sont regroupées en complexes. Un complexe contient des espèces voisines au niveau taxonomique : les caractères intrinsèques (isoenzymes) sont semblables, même si l'épidémiologie et la pathologie peuvent varier parmi les différentes espèces d'un même complexe. Par exemple le complexe *L. donovani*, qui contient les espèces *L. donovani*, *L. infantum*, *L. chagasi*, *L. archibaldi* (voir Table I).

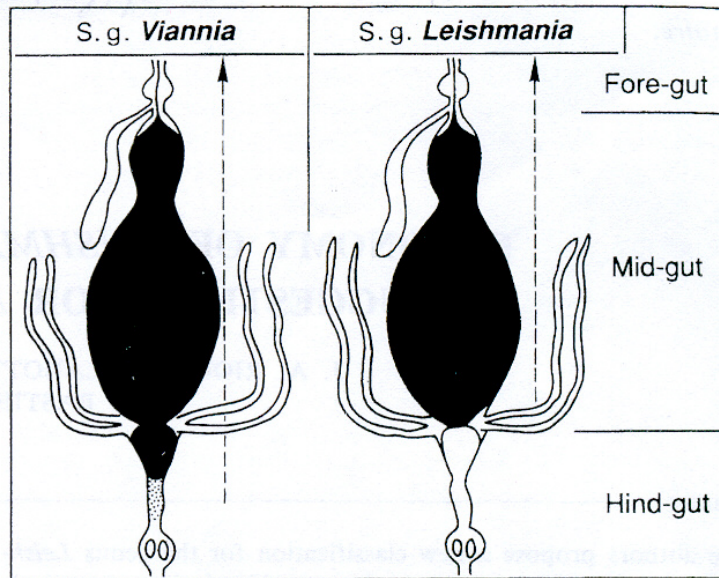


FIG. 1. — Sub-genus *Leishmania* Ross, 1903 and *Viannia* Lainson and Shaw, 1987. Classification based on behaviour in the gut of the sandfly host (according to Lainson and Shaw 1979 and 1987).

Fig. 7 : Classification des sous-genres de *Leishmania* selon la répartition dans le tube digestif du vecteur. D'après Rioux *et al.*, 1990.

D.3. Le Complexe *L. donovani*.

Le complexe *L. donovani* est actuellement composé de quatre espèces de *Leishmania*: *Leishmania donovani*, responsable de la leishmaniose viscérale en Afrique de l'est, Inde, Népal (également appelé Kala-Azar); *Leishmania chagasi*, l'agent de la leishmaniose viscérale en Amérique du sud, *Leishmania infantum*, causant la leishmaniose viscérale dans le bassin méditerranéen et *Leishmania archibaldi*, présent en Afrique de l'est.

D.3.1. *Leishmania infantum* :

Cette espèce de *Leishmania* de l'ancien monde est endémique du bassin méditerranéen à la Chine, mais la Méditerranée reste le principal lieu d'infection. Certains zymodèmes ont été décrits en Afrique de l'est, mais ceci est controversé.

Elle cause généralement la leishmaniose viscérale, mais peut également entraîner des pathologies cutanées. Le parasite est transmis par 5 espèces de phlébotomes (*P. ariasi*, *P. perfiliewi*, *P. perniciosus*, *P. sichuanensis* et *P. smirnovi*), plus une dizaine d'autres espèces de vecteurs potentiels. *L. infantum* comporte 29 zymodèmes permettant ainsi une identification infraspécifique. *L. infantum* se développe selon un cycle zoonotique, le réservoir et la principale victime de cette espèce est le chien domestique ; les infections humaines étant des incidents de parcours relativement rares dans le sud de l'Europe (Italie, Espagne, Provence) sauf chez les personnes atteintes du VIH, qui représentent plus de 70% des cas d'infection avec *L. infantum* (Morales *et al.*, 2001).

D.3.2. *Leishmania donovani* :

Cette espèce de l'ancien monde est responsable de la leishmaniose viscérale anthroponotique, endémique de l'Inde et de l'Afrique orientale. Elle est transmise par *P. argentipes*, un insecte très répandu en Inde. A l'heure actuelle, on ne lui a pas trouvé de réservoir animal.

D.3.3. *Leishmania chagasi* :

Cette espèce endémique de l'Amérique latine ne se différencie de *L. infantum* que par sa localisation géographique et forme avec celle-ci un groupe monophylétique (I.L. Mauricio *et others.*, 1999 ; I.L. Mauricio *et others.*, 2001.), ce qui tend à dire que *L. chagasi* est une importation de *L. infantum*, conséquence de la colonisation espagnole au XVIème siècle(I.L. Mauricio, J.R. Stothard et M.A. Miles, 2000). Le réservoir est, comme pour *L. infantum*, animal (chiens domestiques, mais aussi renards, rats) et le vecteur est un phlébotome du genre *Lutzomyia*, (*Lutzomyia longipalpis*). On peut s'infecter avec *L. chagasi* aussi bien en milieu forestier qu'urbain, en raison des différents réservoirs domestiques/sauvages.

D.3.4. *Leishmania archibaldi* :

L'individualisation de cette espèce, présente en Afrique orientale, n'est pas claire : elle est parfois considérée comme une espèce du complexe *L. donovani* à part entière (F. Pratlong *et others*, 2001), ou comme une sous-population de l'espèce *L. donovani* (Rioux *et al.*, 1990).

Table 1. Simplified classification of the genus *Leishmania*, derived from the phylogenetic analysis of Rioux *et al.* based on isoenzymes (6).

Sub-genus *Leishmania* Ross, 1903

- *L. donovani* complex : *L. donovani* (Laveran & Mesnil, 1903)
L. archibaldi Castellani & Chalmers , 1919
- *L. infantum* complex : *L. infantum* Nicolle, 1908
(syn. *L. chagasi* Cunha & Chagas, 1937)
- *L. tropica* complex : *L. tropica* (Wright, 1903)
- *L. killicki* complex : *L. killicki* Rioux, Lanotte & Pratlong, 1986
- *L. aethiopica* complex : *L. aethiopica* Bray, Ashford & Bray, 1973
- *L. major* complex : *L. major* Yakimoff & Schokhor, 1914
- *L. turanica* complex : *L. turanica* Strelkova, Peters & Evans, 1990
- *L. gerbilli* complex : *L. gerbilli* Wang, Qu & Guan, 1964
- *L. arabica* complex : *L. arabica* Peters, Elbihari & Evans, 1986
- *L. mexicana* complex : *L. mexicana* Biagi, 1953
(syn. *L. pifanoi* Medina & Romero, 1959)
- *L. amazonensis* complex : *L. amazonensis* Lainson & Shaw, 1972
(syn. *L. garnhami*, Scorza *et al.*, 1979)
L. aristidesi Lainson & Shaw, 1979
- *L. enriettii* complex : *L. enriettii* Muniz & Medina, 1948
- *L. hertigi* complex : *L. hertigi* Herrer, 1971
L. deanei Lainson & Shaw, 1977

Sub-genus *Viannia* Lainson and Shaw, 1987

- *L. braziliensis* complex : *L. braziliensis* Vianna, 1911.
L. peruviana Velez, 1913
- *L. guyanensis* complex : *L. guyanensis* Floch, 1954
L. panamensis Lainson & Shaw, 1972
L. shawi Lainson *et al.*, 1989
- *L. naiffi* complex : *L. naiffi* Lainson & Shaw, 1989
- *L. lainsoni* complex : *L. lainsoni* Silveira *et al.*, 1987

Table I : Classification du genre *Leishmania*. D'après Rioux *et al.*, 1990.

E. Méthodes d'identification.

Devant l'inutilité des critères morphologiques dans l'identification des espèces au sein du genre *Leishmania*, d'autres méthodes, de type moléculaire, ont été développées pour permettre l'identification des différentes espèces et même des différentes souches : MLEE, microsatellites, PCR-RFLP, restriction du kDNA, RAPD.

E.1. La MLEE.

La MultiLocus Enzyme Electrophoresis (MLEE) est actuellement la méthode de référence d'identification des *Leishmania*. Dans cette méthode, les critères de classification observés sont les différents allèles d'un locus enzymatique chez les différentes espèces de *Leishmania*. Les allèles sont observés par l'intermédiaire des enzymes issus de la transcription et traduction de ces séquences. Ces enzymes sont appelés isoenzymes (Rioux *et al.*, 1990).

Les isoenzymes sont extraits de cultures de parasites promastigotes et purifiés avant de subir une migration sur un gel. La migration se fait sur gel d'amidon, de polyacrylamide, ou encore d'acétate de cellulose (Rioux *et al.*, 1990). Le gel est ensuite coupé en tranches et les différents isoenzymes utilisés sont révélés séparément par le substrat spécifique de chaque système.

Les différents allèles d'une même enzyme sont caractérisés par leur mobilité électrophorétique, dépendante de la charge électrique globale, donc de la séquence en acides aminés (Solander *et al.*, 1986). Les différentes positions électrophorétiques observées pour une isoenzyme correspondent aux différents allèles de ce locus, le polymorphisme ainsi observé est le reflet de la variabilité de la séquence nucléotidique. Pour l'identification des espèces de *Leishmania*, 20 systèmes enzymatiques peuvent être observés, parmi lesquels : aconitase, alanine amino-transférase, glucose-phosphate isomérase, glucose-6 phosphate déshydrogénase, glutamate oxaloacetate transaminase, isocitrate déshydrogénase, malate déshydrogénase, enzyme malique, mannose phosphate isomérase, nucleoside hydrolase, 6-phosphogluconate déshydrogénase, phosphoglucomutase, peptidase 1, peptidase 2, Superoxide dismutase (Rioux *et al.*, 1990). Ces systèmes possèdent une horloge moléculaire lente, ils varient peu au cours du temps, ils sont stables, donc sont de bons marqueurs. L'identification des différents caractères se fait en comparaison à une souche de référence pour un ou plusieurs isoenzymes (Ces souches de références sont conservées en cryobanques). L'ensemble des profils obtenus pour tous les isoenzymes permettent de déterminer l'espèce à laquelle appartient la souche d'intérêt, et même de différencier plusieurs groupes au sein d'une même espèce. L'ensemble des souches d'une espèce présentant un même profil enzymatique est appelé « zymodème ».

Cette technique d'identification est très spécifique et discriminante, mais elle aussi très longue et lourde au niveau des manipulations (besoin d'isoler les enzymes, de les révéler spécifiquement après la migration). De plus pour avoir une quantité suffisante d'enzymes, les parasites doivent être isolés et cultivés dans des conditions somme toute différentes de celles rencontrées *in vivo*. La caractérisation est alors biaisée par cette étape supplémentaire. C'est pourquoi on recherche actuellement de nouvelles techniques d'identification qui permettraient d'avoir des résultats fiables et reproductibles en un laps de temps plus court, et un pouvoir de discrimination plus élevé, permettant ainsi d'observer du polymorphisme au sein d'un même zymodème, ce qui aurait des applications diagnostiques, phylogénétiques, épidémiologiques. Ces techniques sont essentiellement basées sur l'analyse directe de la séquence nucléotidique elle-même (PCR-RFLP, micro-satellites, RAPD) sans intermédiaire, comme les isoenzymes.

E.2. La PCR-RFLP.

La Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP) est une autre méthode d'identification, basée sur les mutations au niveau des séquences reconnues par des endonucléases, créant ou supprimant des sites de restriction, et générant de par ce fait des fragments d'ADN de longueurs différentes selon les souches étudiées.

La première étape de cette méthode est l'amplification par PCR d'une séquence connue pour être variable (séquences non codantes, antigènes, gènes en tandem). Cette séquence amplifiée est ensuite soumise à une restriction par une endonucléase dont un certain nombre de sites spécifiques a été trouvé dans la séquence. Les produits de restrictions sont finalement analysés par une électrophorèse sur gel d'agarose, de polyacrylamide ou encore en microcapillaire (Agilent Bioanalyzer). Les différents profils observés permettent alors de différencier les souches d'intérêt.

E.3. La RAPD.

La Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD), est l'analyse des différents produits PCR obtenus suite à l'amplification aléatoire de certaines séquences du génome par une seule amorce, un décimère non spécifique d'un site préalablement choisi. Cette amorce va s'hybrider aléatoirement à divers endroits du génome, l'aspect aléatoire de l'hybridation est augmenté par l'utilisation d'une faible température d'hybridation. Les différences entre les souches sont déterminées par l'analyse sur gel des différents produits d'amplification (Guizani *et others*, 2002.). L'avantage de cette technique est qu'elle ne demande aucune connaissance préalable de la séquence de l'ADN étudié. Par contre un criblage des amorces montrant un polymorphisme dans les souches étudiées est nécessaire. De plus, elle nécessite une bonne standardisation des protocoles pour être reproductible (concentration et origine des différents réactifs fixées une fois pour toutes, utilisation d'un seul et même thermocycler pour toutes les amplifications). Mais cette reproductibilité est toute relative, puisqu'elle rend difficile la comparaison des résultats venant de laboratoires différents.

F. Phylogénie.

Les diverses espèces de *Leishmania* dérivent probablement d'un ancêtre commun, un flagellé monoxène d'insecte, de type *Leptomonas*, apparu à l'ère jurassique. Se développant dans la partie inférieure du tube digestif de l'insecte, le parasite se serait d'abord transmis par ingestion aux reptiles. Un groupe voisin de *Leishmania* conserve encore aujourd'hui cette position dans le tube digestif et cet hôte vertébré, il s'agit du genre *Sauroleishmania*.

Ensuite, avec l'adaptation des parasites à la portion supérieure du tube digestif des nématocères, arrivèrent les premiers mammifères et phlébotomes hématophages. Ces nouvelles conditions permirent la transmission du parasite à un nouvel hôte par injection. Ce mode de transmission s'est maintenu jusqu'aux *Leishmania* actuelles (Lainson et Shaw, 1986).

Dans le genre *Leishmania*, seules les espèces du sous-genre *Viannia* (*L. braziliensis*, *L. guyanensis*) colonisent encore la partie inférieure du tube digestif, comme le faisait l'espèce ancestrale, ce qui pourrait dire que ce sous-genre est le plus ancien ; et comme *Viannia* ne se trouve que dans le nouveau Monde, on peut penser qu'il s'agit du foyer

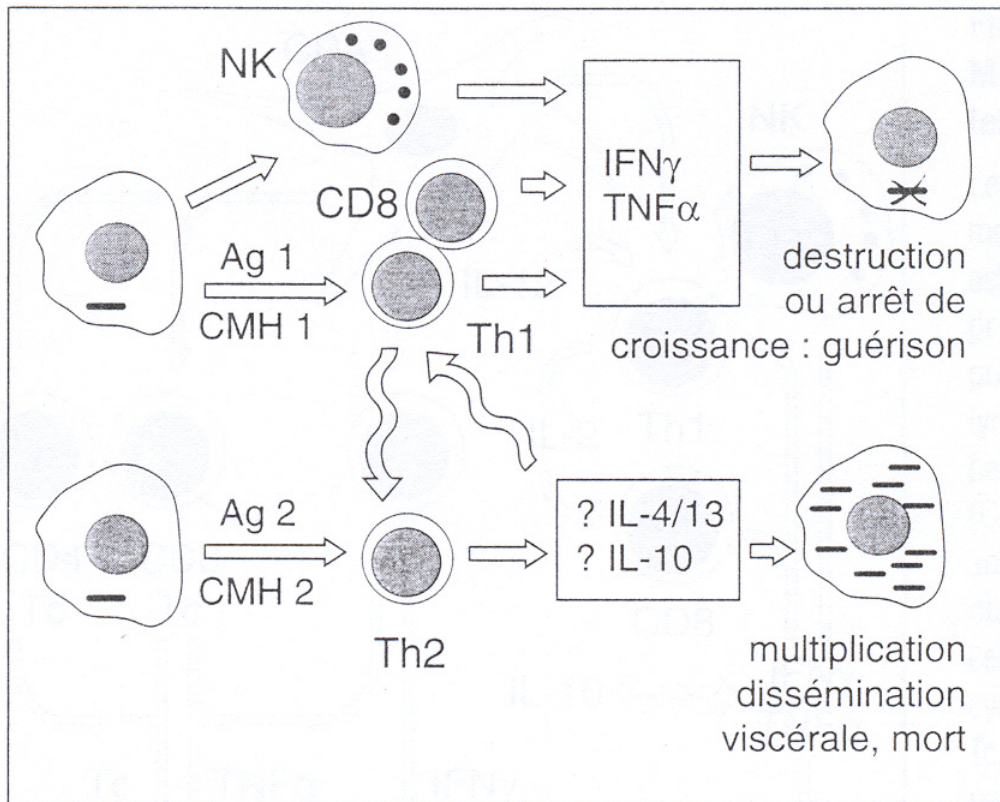


Fig. 8 : Schéma de la réponse immunitaire suite à une infection par *Leishmania*. D'après Revillard (2001).

d'émergence du genre *Leishmania*, et que les parasites se seraient répandus plus récemment dans l'ancien Monde (Lainson et Shaw, 1986).

2. La maladie.

A. Pathogenèse-Immunologie-Aspects cliniques.

La présence du parasite dans l'organisme crée un déséquilibre dans la réponse immunitaire à l'origine de la pathologie: la leishmaniose.

Pendant le repas sanguin, avant même l'infection, les molécules de la salive du vecteur dont la fonction première est de faciliter l'absorption du sang de l'hôte vont également jouer en faveur de l'infection du parasite. Face au stress causé par la piqûre, la réaction de l'hôte est de synthétiser des agents vasoconstricteurs et procoagulants. Pour éviter cette réaction qui rendrait le sang difficile à atteindre, le vecteur injecte sa salive, laquelle va favoriser la vasodilatation et inhiber la coagulation et la réaction inflammatoire au niveau de la piqûre. Cette immunosuppression locale permet non seulement au vecteur de se nourrir, mais elle favorise également l'infection par le parasite (M.C. de Almeida *et al.*, 2003.).

Suite à l'infection, le système immunitaire va développer une réponse à cette population étrangère. De l'orientation de cette réponse (Th1 ou Th2) dépend l'évolution de la maladie (voir Fig. 8).

A.1. Infection sub-clinique.

Lors de l'infection, certains parasites sont détruits (par le complément, ou n'étaient pas prêts pour résister à l'environnement intracellulaire du macrophage). Les épitopes sont montrés en surface des phagocytes sur les molécules du CMH de classe II et présentés à des lymphocytes TH1 CD4+. Le lymphocyte reconnaissant l'épitope étranger va s'activer et sécréter de l'interleukine 2 (IL-2) et de l'interféron gamma, (INF- γ) qui vont respectivement:

- Activer les Lymphocytes Th1 et les cellules Natural Killer.
- Activer les macrophages et les rendre "résistants" à l'infection, plus aptes à tuer les leishmanies.

Ainsi, le système immunitaire se dirige vers une réponse cellulaire (Th1), et les macrophages activés libèrent du Tumor Necrosis Factor α (TNF- α) et de l'IL-12, qui vont également favoriser la lutte contre le parasite intracellulaire. Si cette réponse est normale, le système immunitaire parvient à contrôler le parasite et empêcher sa multiplication. Le porteur est sain et l'infection est asymptomatique; on parle d'infection sub-clinique.

A.2. Leishmaniose cutanée.

Par contre, la réponse Th1 peut être exacerbée et échapper au contrôle du système immunitaire. Dans cette situation, l'infection des macrophages reste localisée au site d'inoculation du parasite, il y a formation d'un granulôme à cet endroit: une zone d'inflammation contenant les macrophages infectés au centre, entourés d'une couche de cellules immunitaires (Lymphocytes T et B, phagocytes). Ce granulôme empêche la

dissémination du parasite dans le corps de l'hôte. Mais cette situation d'inflammation chronique conduit à une nécrose des tissus voisins. Cette nécrose peut mener à une lésion plus ou moins légère et bénigne mais assez longue à guérir. Ce développement de l'infection est appelé leishmaniose cutanée.

La leishmaniose cutanée (causée entre autre par *L. major*, *L. aethiopica* ou encore *L. mexicana*.) apparaît généralement quelques mois (entre 1 et 4 mois) après la piqure et se présente souvent sous la forme d'une ou plusieurs lésions ulcérées (lésion humide, bouton d'Orient), résultant de la nécrose du granulôme et des tissus voisins (voir Fig. 9). Mais elle peut également prendre d'autres formes: lésion sèche, couverte de plaques; lésion végétante, qui se développe en relief. Cette lésion est rarement fatale et se guérit souvent d'elle-même. Cependant cette guérison peut être relativement longue (jusque 5 ans pour une infection de *L. aethiopica*) et laisse généralement une cicatrice.

A.3. Leishmaniose muco-cutanée.

La situation d'infection localisée peut également dégénérer si le granulôme forme des "métastases" se répandant dans l'organisme et plus particulièrement au niveau des muqueuses de la bouche et du nez (environ 10% des leishmanioses dues à *L. braziliensis*). L'ulcération dans cette zone est particulièrement destructive et due à une réponse habituellement orientée Th1. Cette forme de la maladie est la leishmaniose muco-cutanée, résultant d'une infection à *L. braziliensis*. La lésion superficielle est guérie, mais les parasites sont toujours présents dans l'organisme. Ils se répandent alors et se développent lentement (de un à quarante ans pour voir apparaître les premiers symptômes) au niveau des muqueuses, généralement le nez en première position (voir Fig.10). Comme dans le cas d'une leishmaniose cutanée il va y avoir formation d'un granulôme et la réponse immunitaire, exagérée, va mener à la destruction des muqueuses puis des organes (nez, palais, cordes vocales). Cette forme clinique de leishmaniose est grave et peut être fatale car la lésion est propice aux infections secondaires comme la pneumonie, et cette destruction d'organes peut empêcher le malade de respirer et/ou s'alimenter correctement, sans oublier les conséquences sociales de ces défigurations.

Rem :Il existe encore d'autres complications de la leishmaniose cutanée, des formes chroniques comme la leishmaniose diffuse (dissémination des cellules infectées sur toute la surface de la peau, par le système lymphatique) ou la leishmaniose recidivans (nouvelle lésion, voisine d'une précédente infection).

A.4. Leishmaniose viscérale.

La réponse immunitaire peut être aussi déviée au début de l'infection vers une réponse TH2, elle serait même induite par différents peptides du parasite comme LACK (*Leishmania* homologue of mammalian receptors for activated C kinase I), qui serait reconnu par les cellules CD4+ et stimulerait la synthèse d'IL-4, une cytokine activant les lymphocytes B et inhibant l'effet de l'IL-12 (MC de Almeida *et al.*, 2003). L'immunité cellulaire est réprimée et les macrophages infectés peuvent alors se répandre dans l'organisme et les parasites qu'ils contiennent vont infecter les organes profonds (le foie, la rate, la moelle osseuse, ganglions lymphatiques...) dans lesquels vont se former des granulômes. Ces granulômes vont déclencher dans les organes des stress tels qu'hyperplasie, hypertrophie, nécrose : c'est la leishmaniose viscérale (voir Fig. 11).



Fig. 9 :Exemple de lésion cutanée « sèche » due à *L. major* dans l'ancien monde. Ref : Topics in international health, CD-ROM « Leishmaniasis » (2000).



Fig.10 : Leishmaniose muco-cutanée due à *L. braziliensis*, forme clinique spécifique du nouveau monde. Ref : Topics in international health, CD-ROM « Leishmaniasis » (2000).



Fig. 11 : Leishmaniose viscérale due à *L. donovani* dans le vieux monde. Ref : Topics in international health, CD-ROM « Leishmaniasis » (2000).



Fig. 12 : Leishmaniose canine, due à *L. chagasi*. (nouveau monde). Ref : Ref : Topics in international health, CD-ROM « Leishmaniasis » (2000).

La leishmaniose viscérale (pouvant être due à une infection par *L. donovani*, *L. infantum* dans le vieux monde ou encore *L. chagasi* dans le nouveau monde) est donc le résultat d'une infection générale et profonde par le parasite.

Ces organes sont infectés par le passage dans le sang de macrophages contenant des parasites. La présence des parasites dans ces zones de l'organisme déclenche aussi une réponse inflammatoire et la formation de granulômes. Ensuite il y a infiltration cellulaire, menant à une hyperplasie et une hypertrophie de ces organes (hépatosplénomégalie) ce qui induit une nécrose des tissus par la compression des vaisseaux sanguins. De plus d'autres problèmes viennent s'ajouter à ces infections: dépôts de complexes immuns dans les reins, anémie suite à l'infiltration du parasite dans la moelle osseuse, dégradation de la paroi intestinale, douleurs abdominales, fièvres, malaises, diarrhées.

Cette parasitémie mène à la mort un ou deux ans après son apparition si elle n'est pas efficacement soignée

A.5. Infections animales.

La leishmaniose n'est pas inféodée aux humains, les autres hôtes peuvent également développer la parasitémie, comme le chien.

Le chien domestique est le réservoir prouvé pour *L. infantum* dans le bassin méditerranéen. Mais tous les chiens porteurs du parasite ne présentent pas forcément les symptômes relatifs au développement du parasite (L.M. Campino, 2002.).

La leishmaniose canine se caractérise généralement par une forme viscérale: une inflammation chronique et proliférative dans le foie, la rate, la peau; associée à une nécrose des tissus (L.M. Campino, 2002.). Le chien malade se retrouve amaigri et affaibli, les muscles (fasciaux) s'atrophient, il perd ses poils, développe des lésions cutanées (souvent au niveau des oreilles, des yeux ou du museau) et subit une hypertrophie des ongles (voir Fig. 12). Il apparaît aussi une hépatosplénomégalie. Le parasite conduit à la mort de l'animal suite à des complications de la pathologie: glomérulo-néphrite suite aux dépôts de complexes immuns, lésions pulmonaires. (J. Dereure, 1999).

B. Antigènes et variabilité antigénique.

B.1. La GP 63 : Fonctions et organisation génomique.

La glycoprotéine 63 (GP63), également appelée protéine majeure de surface (Major Surface Protein : msp) est une protéine membranaire de 63 kDa (d'où son nom), exprimée très abondamment chez *Leishmania* : elle représente 1% de la quantité totale de protéines. Cette abondance est constante chez toutes les espèces de *Leishmania* (Chang et Chaudhuri, 1990).

La GP 63 est considérée comme un des principaux facteurs de virulence de *Leishmania* (Chang *et al.*, 1990 ; K. Victoir et J.C. Dujardin, 2002). En effet, cette protéine est une Zinc métallo-protéase, dont l'activité catalytique est requise pour les premiers stades de l'infection : elle intervient dans la lyse des composés du complément fixés sur la membrane du parasite en composés inactifs. La GP 63 est également reconnue par certains récepteurs du macrophage, ce qui facilite l'endocytose du parasite. Une fois dans l'environnement intralysosomal, l'activité de la GP 63 est encore nécessaire à la dégradation des différentes protéases de ce milieu, donc à la survie du parasite. Cette enzyme contient aussi de nombreux épitopes B et T, et interagit fortement avec le système immunitaire.

Le gène de la GP63 est présent en de multiples copies consécutives sur le chromosome 10 (S. Guerbouj *et al.*, 2001. ; I.L. Mauricio *et al.*, 2001.). Ces copies ont une taille approximative de 3 kb et sont composées d'une séquence codante d'1,8 kb, suivie par une séquence non codante de 1,3 kb (K. Victoir *et al.*, 1998).

Le niveau d'expression des différentes copies est variable. En effet, l'expression de chaque copie est différente selon la phase de croissance dans laquelle se trouve le parasite ; les copies peuvent être ainsi réparties en trois types (également appelés isogènes) :

- mspL : les copies préférentiellement exprimées pendant la phase de croissance logarithmique.
- mspS : les copies du gène de la GP 63 préférentiellement exprimées durant la phase stationnaire (pendant la métacyclogenèse).
- mspC : les copies exprimées constitutivement.

Les différentes copies d'un isogènes sont généralement regroupées au même endroit sur le chromosome, Par contre le nombre de copies et d'isogènes de la GP 63 est différent selon l'espèce de *Leishmania* : chez *L. major*, on ne trouve que 7 copies, réparties en 2 isogènes, *L. infantum* possède 18 copies qui sont arrangées en 3 isogènes. Les espèces du sous-genre *Viannia* ont encore un plus grand nombre de répétitions : jusqu'à 70 répétitions dans 7 isogènes pour *L. braziliensis* (K Victoir, 2001).

La séquence codante est constituée d'une partie conservée et d'une partie plus variable, à l'extrémité 3'. La région observée correspond aux séquences d'acides aminés nécessaires au bon repliement de la protéine et du site actif pour la partie conservée. Les régions variables se retrouvent au niveau de la surface de l'enzyme, et peuvent correspondre à des épitopes T et B (K Victoir et J.C. Dujardin, 2002).

B.2. La Cystéine Protéinase B : Fonction et organisation génomique.

La cystéine protéinase B (CPB) est une enzyme qu'on retrouve dans un lysosome modifié : le mégasome (bien développé dans la forme amastigote). Cette enzyme fait partie de la famille des cystéines protéinases, qui contient également les enzymes CPA et CPC.

La CPB intervient dans l'inhibition de la réponse immunitaire de type Th1, préparant ainsi à une leishmaniose viscérale. Cet effet immunosuppresseur fait de la CPB un facteur de virulence (L.U. Buxbaum *et al.*, 2003). Même si la CPB est située principalement dans le mégasome, elle peut être également dans des zones où elle est en contact avec les constituants de l'hôte et libre d'interagir avec ceux-ci, comme le phagolysosome des macrophages infectés ou encore le milieu extracellulaire au niveau des lésions.

Les mécanismes par lesquels la CPB inhibe l'orientation Th1 de la réponse immunitaire ne sont pas encore parfaitement compris. Toutefois, par les études d'autres cystéines protéases chez *Leishmania* et d'autres organismes, on pense que la CPB supprime la présentation d'antigène en clivant les molécules du CMH de classe II ; ou qu'elle empêche la prolifération des lymphocytes T par le clivage de substrats tels que l'IL-12 ou le récepteur à l'IL-2 (L.U. Buxbaum *et al.*, 2003). Divers épitopes B et T ont été retrouvés dans la CPB (*et al.*, 2001).

Dans la famille des cystéines protéinases, seule la CPB est un gène en tandem, comprenant 5 répétitions chez les espèces du complexe *L. donovani*, 19 répétitions chez *L. mexicana* (V. Mundodi *et al.*, 2002). Ces répétitions sont composées d'une séquence codante de 1,3 kb, suivie d'une région non traduite de 1,4 kb.

C. Diagnostic

Le diagnostic de la leishmaniose a pour but de démontrer la présence ou l'absence du parasite chez une personne potentiellement infectée. Ensuite si l'infection est bien réelle, d'identifier l'espèce de *Leishmania*, pour ensuite appliquer le traitement approprié.

La première étape du diagnostic se fait sur le terrain, et est basée sur les manifestations cliniques des différentes leishmanioses et les données épidémiologiques (zone endémique ou non, le sujet a-t-il déjà été infecté). Cette étape permet de faire un premier criblage, mais les tests doivent être confirmés par des méthodes plus spécifiques. En effet, les leishmanioses présentant des symptômes communs avec d'autres pathologies : la leishmaniose viscérale peut être confondue entre autre avec la malaria, la malnutrition, la fièvre typhoïde ; et on peut confondre les lésions de la leishmaniose cutanée avec celles causées par la lèpre ou diverses mycoses. De plus, les molécules utilisées dans les traitements anti-*Leishmania* ont généralement des effets secondaires et sont coûteux. On a donc besoin d'outils capables de révéler la présence des *Leishmania* et de limiter au maximum le nombre d'erreurs de diagnostic (faux positifs et faux négatifs).

Il existe plusieurs méthodes de diagnostics.

C.1. Diagnostic parasitologique.

Le diagnostic parasitologique met en évidence le parasite lui-même à partir de prélèvements chez le malade (biopsie, aspiration au niveau de la moelle osseuse, de la rate), les parasites sont observés au microscope (méthode la plus simple, mais aussi la moins sensible), en culture (mais certaines espèces, comme *L. braziliensis*, sont très difficiles à faire croître en milieu), ou encore injectés dans un animal de laboratoire, qui développera la forme clinique de la maladie en quelques semaines.

C.2. Diagnostic sérologique.

Le diagnostic sérologique cherche à mettre en évidence la réponse immunitaire due à la présence du parasite dans l'organisme ; c'est-à-dire les anticorps dans le cas d'une leishmaniose viscérale et la réponse cellulaire pour la leishmaniose cutanée (Singh et Sivakumar, 2003). Parmi les méthodes de diagnostic sérologique, on peut citer :

- le test cutané à hypersensibilité retardée. Un lot de promastigotes morts est injecté dans le derme du patient. En cas de leishmaniose cutanée (présente ou passée), une réaction inflammatoire sera observée au niveau de la piqûre.
- Le DAT (Direct Agglutination Test) met en évidence les anticorps Anti-*leishmania* en mettant en contact une suspension de promastigotes avec plusieurs dilutions de sérum. On observe une agglutination en cas de test positif.
- L'ELISA (Enzyme-linked immunoabsorbent assay) ou Dot-ELISA. avec des antigènes de *Leishmania* pour mettre en évidence la présence d'anticorps anti-*Leishmania* chez le sujet (Ce test, tout comme le DAT, ne sera positif que pour un cas de leishmaniose viscérale

C.3. Autres méthodes.

Les diagnostics moléculaires, tels que des PCR spécifiques du genre, mettant ainsi *Leishmania* en évidence.

Le problème du diagnostic est de pouvoir développer une technique qui soit rapide, sensible et spécifique, tout en étant adaptée pour des tests de terrain (par exemple le dot-ELISA) (Singh et Sivakumar, 2003). Ce qui est encore loin d'être le cas pour les méthodes moléculaires.

D. Traitements

D.1. Les dérivés stibiés.

Parmi les médicaments utilisés dans le traitement de la leishmaniose, les plus largement employés sont les dérivés pentavalents de l'antimoine (Rosenthal et Marty, 2003). Ces dérivés sont utilisés sous la forme de deux molécules : l'antimoniote de N-méthyl glucamine (Glucantime) et le stibogluconate de sodium (Pentosan). Ces molécules, injectées par voie intramusculaire ou intraveineuse, viennent à bout des *Leishmania* en inhibant des mécanismes vitaux tels que la glycolyse ou la synthèse d'ATP. Les antimoniaux sont des agents anti-leishmaniens efficaces (80% de guérison) et rapidement éliminés de l'organisme. Seulement, ils peuvent s'accumuler suite à une élimination incomplète, causer des effets secondaires (mais rarement fatals) comme hyperthermie, anémie, troubles cardiaques, hépatiques, pancréatiques. (J.-P. Dedet, 1999). De plus, l'apparition et le développement de résistances aux antimoniaux dans les zones de forte endémie (par exemple le Bihar, en Inde) et/ou d'utilisation irrégulière des médicaments limitent leur utilisation, mais il existe d'autres agents anti-leishmaniens.

D.2. L'amphotéricine B.

L'amphotéricine B fait également partie des traitements de première ligne. Cette antifongique est aussi très efficace contre les *Leishmania*, elle en augmente la perméabilité membranaire ce qui entraîne une perte de substances chez les parasites, elle active également les macrophages. L'efficacité de cette molécule est énorme (100% de guérison) même avec les souches résistantes à l'antimoine. Mais l'amphotéricine B a également de nombreux effets secondaires : crampes, vertiges, convulsions, vomissements, ... en cas d'intolérance et insuffisance rénale, anémie, hypokaliémie dues à la toxicité de la molécule.

L'amphotéricine B est transmise au patient par intraveineuse, sous sa forme native ou associée à un liposome (Amphotéricine B encapsulée). L'amphotéricine B encapsulée agit de la même façon que la forme simple, est tout aussi efficace et même souvent supérieure, et présente une toxicité moindre (entre 50 et 75 fois) (Rosenthal et Marty, 2003). Par contre, elle est beaucoup plus chère que la forme non encapsulée.

D.3. La Miltefosine.

Depuis peu (2 ans seulement), une nouvelle substance, initialement développée dans la recherche contre le cancer, est également utilisée dans le traitement de la leishmaniose viscérale : la Miltefosine, (ou hexadecyl phosphocholine). Cette molécule agit au niveau du

métabolisme des lipides en inhibant une enzyme associée au glycosome intervenant dans la synthèse des acyl-glycérophospholipides (B. More *et al.*, 2003). Cette inhibition entraîne des anomalies dans la composition de la membrane lipidique, causant des modifications de perméabilité membranaire (R. Prasad *et al.*, 2004).

La miltefosine est administrée oralement dans le traitement de la leishmaniose viscérale et cutanée ; elle présente toutefois des effets secondaires, mais à un moindre niveau que les dérivés stibiés ou l'amphotéricine B (le plus souvent nausées et vomissements) (B. More *et al.*, 2003).

La miltefosine montre de très bons taux de guérison (jusque 100%) avec peu de cas de rechute ; de plus, elle est administrable par voie orale ce qui constitue un avantage opérationnel considérable.

D.4. Autres agents anti-Leishmaniens.

Il existe encore d'autres agents anti-leishmaniens, tels que la pentamidine, bloquant la transcription chez le parasite, l'aminosidine, un antibiotique se fixant aux ribosomes leishmaniens.

D.5. Modes de traitements.

Tous les traitements ne conviennent pas pour toutes les formes de la maladie. La leishmaniose viscérale, mortelle si non soignée, doit être traitée rapidement et efficacement. Les traitements font ici principalement appel aux antimonies pentavalents et à l'amphotéricine B. Cette dernière est utilisée en premier dans les situations de résistance aux dérivés stibiés et de leishmaniose viscérale chez les immunodéprimés, également réfractaires aux dérivés de l'antimoine. Ce type de traitement est également appliqué en cas de Leishmaniose cutanéomuqueuse.

Le traitement de la leishmaniose cutanée peut-être local ou systémique. Le traitement local se fait par l'injection d'antimonies au niveau de la lésion (si celle-ci est simple). Le traitement global se fait quand le nombre de lésions est trop élevé pour permettre un traitement local, les médicaments sont ici des agents comme l'allopurinol, administré par voie orale. Dans le cas de leishmanioses cutanées plus graves (recidivans, diffuse, ou pouvant dégénérer en infection cutanéomuqueuse), le traitement appliqué est plus lourd, avec des intraveineuses d'antimonies ou d'amphotéricine B.

E. Association avec le SIDA.

La leishmaniose présente un grand problème d'association avec le SIDA; depuis la première observation d'une co-infection, en 1985 (A. De La Loma, 1985), le nombre de cas ne cesse d'augmenter: en Europe, plus de 70% des cas de leishmanioses viscérales sont déclarées chez des séropositifs, et 9% des sidéens sont également co-infectés (C. Chicharro *et al.*, 2002). Cette co-infection pourrait partir d'une parasitémie asymptomatique, contrôlée par l'hôte; jusqu'à ce qu'une immunodépression cellulaire (comme celle causée par le VIH) permette au parasite, qui n'est plus restreint par la réaction immunitaire, de se développer ; ou à l'inverse d'une infection récente par *Leishmania* chez un sujet immunodéprimé.

Cette coinfection est grave car chacune des pathologie favorise le développement de l'autre : *Leishmania* comme le virus du HIV inhibent la réponse Th1 (Celle appropriée pour

lutter contre ces infections) et favorisent la réponse Th2 (d'aucune utilité contre les intrus intracellulaires).

Les populations les plus à risque de développer cette co-infection en Espagne sont les toxicomanes se droguant par intraveineuse: ils représentent 70% des cas de co-infections (Desjeux et Alvar, 2002). Via leurs seringues, ils peuvent échanger non seulement le VIH, mais aussi des *Leishmania*.

La co-infection Leishmaniose/VIH se présente le plus souvent comme une leishmaniose viscérale : fièvre, hépatosplénomégalie, anémie et leucopénie aggravées,... auxquelles peuvent venir s'ajouter des symptômes atypiques : lésions cutanées, pulmonaires, ou au niveau du tube digestif (Alvar *et al.*, 1997).

Le diagnostic de cette coinfection peut se faire au niveau clinique, par l'observation des symptômes typiques de la leishmaniose viscérale (fièvre, hépatosplénomégalie) et ceux de la coinfection (anémie, leucopénie, infestation du tube digestif) mais ce type de diagnostic est difficile et faillible, car les symptômes peuvent être absents (Desjeux et Alvar, 2002). Le diagnostic sérologique est peu efficace et doit être répété, en raison de la faible quantité d'anticorps présents chez ces patients (La réponse humorale est faible car il n'y a pas de stimulation par les cellules présentatrices d'antigènes, sauf chez les personnes initialement infectées par *Leishmania*, Alvar *et al.*, 1997) Dans cette situation, le diagnostic parasitaire devient crucial. Les parasites sont mis en évidence à partir d'échantillons de moelle osseuse, de sang, de lymph, par microscopie ou mise en culture

Le traitement de la leishmaniose en coinfection avec le VIH se fait, comme chez les sujets immunocompétents, au moyen d'antimoniés pentavalents et surtout d'amphotéricine B. Mais ces traitements ne permettent pas la guérison, les rechutes sont nombreuses, en raison de l'immunosuppression induite par le VIH (Alvar *et al.*, 1997), et une chimioprophylaxie secondaire à base de glucantime ou d'ambisome doit être envisagée. Malgré tout ces traitements, la coinfection est souvent fatale en quelques mois.

La coinfection du VIH avec une leishmaniose cutanée existe, mais est beaucoup plus rare.

3. Epidémiologie.

A. Transmission.

Le cycle naturel de *Leishmania* peut être zoonotique (*L. chagasi*, *L. infantum*) donc ne passant pas par un hôte humain, ou au contraire anthroponotique (*L. donovani*, *L. major*) dans lequel l'homme est le réservoir du parasite, ou encore anthrozoonotique (le vecteur transmet le parasite d'un hôte vertébré animal à un autre, humain), cela dépend des milieux, de la nature du réservoir et des préférences trophiques des différentes espèces de phlébotomes.

A.1. Transmissions naturelles.

Le réservoir est l'hôte vertébré "principal" d'une espèce de *Leishmania*, et celui qui détermine le type de transmission. C'est l'espèce d'hôte qui dissémine l'infection dans le milieu ; il maintient à niveau les populations de parasites, particulièrement pendant les périodes de non-transmission, comme l'hiver dans les zones endémiques tempérées; il correspond également à la première source de nourriture pour les phlébotomes femelles du

milieu correspondant. Idéalement, pour que la quantité de parasites se maintienne ainsi dans le milieu pendant une période relativement longue, il faut que la pathogénicité soit réduite chez l'hôte réservoir, mais la réalité est différente (les chiens domestiques, réservoirs de *L. infantum*, développent une leishmaniose générale fatale, ce qui pourrait dire qu'ils sont réservoir de *L. infantum* depuis relativement peu de temps au niveau de l'évolution (L. M. Campino, 2002)). La nature du réservoir dépend non seulement de l'espèce de *Leishmania* présente dans l'environnement, mais également de celle du vecteur et de ses préférences trophiques.

Généralement les réservoirs de leishmanies sont des mammifères (souris pour *L. mexicana*, chiens pour *L. infantum*) mais l'homme peut aussi jouer le rôle de réservoir (leishmanioses antroponotiques) comme pour *L. donovani*.

La nature du réservoir dépend également du milieu endémique : les cycles anthroponotiques prennent souvent place dans des milieux urbains, tandis que les cycles zoonotiques sont inféodés aux milieux ruraux et forestiers.

Mais tout animal infecté et développant la maladie n'est pas forcément un réservoir: il peut s'agir d'hôtes secondaires ou accidentels (comme l'homme dans le cas de *L. infantum*). Ces hôtes interviennent peu dans le maintien de la population de parasite dans le milieu. Mais ils ont néanmoins porteurs du parasites et peuvent le disséminer dans un autre environnement et ainsi créer un nouveau foyer d'infection (L.M. Campino, 2002).

A.2. Transmission à l'aide d'un vecteur artificiel.

Un autre type de transmission de la leishmaniose est en augmentation, surtout dans le bassin méditerranéen : il s'agit de la contamination par les seringues chez les toxicomanes des régions endémiques. Ce type de transmission est d'autant plus dangereux qu'elle est fortement disséminative (échange de seringues contenant du sang contaminé) et s'accompagne souvent d'une transmission du VIH. Les drogués forment ainsi une population doublement à risque, c'est d'ailleurs chez les toxicomanes que se dénombre le plus grand nombre de cas de coinfection leishmaniose/VIH (70% des cas, (Desjeux and Alvar, 2002)). En Espagne, on a pu observer chez des sujets immunodéprimés de nouveaux zymodèmes de *Leishmania infantum*, encore jamais observés chez le chien et le phlébotome (MON-198, MON-199, MON-282, MON-283, MON-284). Ces zymodèmes pourraient être moins virulents, et détruits chez les sujets immunocompétents. Par contre ils se développeraient chez les sujets immunodéprimés (souvent par une coinfection avec le VIH), et seraient transmis exclusivement de manière anthroponotique, via les seringues contaminées (Chicharro *et al.*, 2002).

B. Programmes de contrôle.

Comme expliqué précédemment, la leishmaniose est une maladie complexe, montrant une diversité clinique (lésions cutanées, ou viscérales), épidémiologique (anthroponose, zoonose, différentes espèces de vecteurs et de réservoirs), écologique (milieu urbain/rural/sauvage) socio-économique. Une solution unique pour lutter contre ce parasite n'est pas possible, les programmes de contrôles doivent tenir compte des caractéristiques de chaque foyer d'infection.

Pour les foyer anthroponotiques de leishmaniose cutanée (*L. major*, *L. tropica*) ou viscérale (*L. donovani*), la lutte s'organise principalement autour d'un diagnostic (sérologique et/ou parasitologique) au premier stade de l'infection et d'un traitement rapide (aux antimonies, sauf dans les zones de résistance). A ces traitements chez le réservoir humain s'ajoute une lutte contre le vecteur, passive (utilisation de moustiquaires) ou active (les zones péri- et intradomestiques sont traitées à l'insecticide) ; et une sensibilisation de la population (Desjeux, 1999).

Contre les leishmanioses zoonotiques, il y a peu de contrôles au niveau du réservoir, seulement de la prévention par le dépistage des cas humains. Une action peut parfois être menée contre les autres acteurs (diagnostic et traitement des chiens, dissémination de substances toxiques contre les rongeurs), mais pas toujours : en Amérique latine, beaucoup d'espèces de réservoirs et de vecteurs sont sylvestres, donc difficiles à atteindre (Desjeux, 1999).

A ces problèmes biologiques s'ajoutent des complications humaines : coût du diagnostic et des traitements, manque d'infrastructures et de moyens dans les pays endémiques.

4. *Leishmania infantum* en Espagne.

Leishmania infantum est l'espèce endémique en Espagne (et dans tout le sud de l'Europe). Dans ce milieu à l'ouest de la Méditerranée, le parasite suit un cycle zoonotique, il est transmis via deux espèces de phlébotomes (*P. ariasi* et *P. perniciosus*) à l'hôte réservoir, le chien domestique ; et plus rarement, à l'homme.

Parmi les zymodèmes identifiés au sein de *L. infantum*, c'est le zymodème MON-1 qui prédomine dans l'ouest du bassin méditerranéen: en Espagne il cause 90% des leishmanioses viscérales et 20% des leishmanioses cutanées humaines, 95% des leishmanioses canines et est présent dans plus de 50% des co-infections avec le SIDA. (Chicharro *et al.*, 2002). Pour mieux étudier la transmission du parasite et distinguer les rechutes des reinfections dans cette population assez homogène, il est nécessaire de développer des outils caractérisés par un fort pouvoir discriminatoire, donc capables d'identifier précisément les souches de parasites, même au sein d'un seul zymodème (fingerprinting). C'est là qu'intervient le projet de génotypage des souches européennes de *Leishmania*, qui cherche à développer une série de marqueurs possédant une grande sensibilité et un haut pouvoir de discrimination (Quispe *et al.*, 2004).

Hypothèses et objectifs du mémoire.

La technique de référence utilisée actuellement pour l'identification de *Leishmania*, la MLEE, présente des limites. En plus des problèmes techniques (protocole long et lourd), des biais induit par certaines de ces étapes (croissance des parasites en culture), il s'agit d'une méthode d'analyse indirecte, incapable de repérer entre autre les mutations silencieuses. Enfin, elle manque de pouvoir discriminatoire pour l'analyse de certaines populations (par exemple MON-1 en Europe).

Il convient donc de chercher d'autres marqueurs, permettant une analyse directe au niveau de la séquence nucléotidique et ayant un pouvoir de discrimination plus élevé que la MLEE. Idéalement, ces marqueurs devraient pouvoir être analysés directement dans les tissus infectés.

Parmi les marqueurs potentiels, les gènes de protéines intervenant dans la relation hôte-parasite comme les antigènes, sont des cibles intéressantes. En effet, les séquences codantes d'antigènes de *Leishmania* peuvent être répétées, par exemple celles de la GP63 ou de la CPB. Sous l'influence de la pression de sélection induite par la réponse immunitaire, ces séquences sont sujettes à des réarrangement de séquences, des variations antigéniques dont les cas favorables à la survie du parasite sont conservés. La capacité de ces séquences à démontrer le polymorphisme est d'autant plus grande que ces gènes sont répétés, offrant ainsi un répertoire de variants. Enfin, ces gènes répétés en tandem sont séparés par des séquences non codantes, théoriquement soumises à une autre pression de sélection.

Il serait donc intéressant de comparer la polymorphisme au sein de ces différents loci.

L'objectif global de ce mémoire est inscrit dans le cadre du projet de génotypage des souches européennes de *Leishmania*, qui recherche de nouveaux marqueurs moléculaires et d'outils épidémiologiques associés permettant le « fingerprinting », bref la caractérisation spécifique au niveau de la souche de *Leishmania*.

Donc, dans le cadre de ce projet, notre objectif est de caractériser le polymorphisme de 25 souches espagnoles appartenant à *L. infantum*, zymodème MON-1. Pour cela nous avons analysé la variabilité (i) au niveau des séquences codantes répétées de deux antigènes : la GP63 et la CPB et (ii) au niveau des séquences non codantes séparant les répétitions de la CPB. Ceci a été effectué par amplification PCR de ces séquences, suivi par un clivage avec une batterie d'enzymes de restriction.

En parallèle à cette analyse par PCR-RFLP, nous avons également tenté de caractériser ces souches espagnoles par la méthode RAPD.

Enfin, ces résultats ont été comparés à ceux obtenus sur le même échantillon par une équipe espagnole étudiant le polymorphisme de séquences d'ADN kinétoplastique (kDNA).

II

Matériel et méthodes

1. Souches de *Leishmania*.

Nous avons reçu 25 échantillons d'ADN génomique de *Leishmania infantum*, zymodème MON-1, fournis par l'Institut de Médecine tropicale de Madrid (Centro Nacional de Microbiología Instituto de Salud Carlos III). Ces échantillons proviennent de prélèvements au niveau de la moelle osseuse, du sang, ou encore des ganglions lymphatiques, de 23 individus infectés, hommes et chiens, originaires des alentours de Madrid, ainsi que de Majorque et Ibiza, deux îles méditerranéennes appartenant à l'archipel des Baléares (Voir Table I et Fig. 1).

Ces échantillons proviennent tous d'individus infectés différents, à l'exception de 4 souches. Les souches numérotées 4 et 5 proviennent d'un même patient immunodéprimé. Un premier prélèvement a été fait, avant d'appliquer le traitement. Une rechute dans la maladie est survenue trois mois après la fin de celui-ci. C'est à ce moment-là que le deuxième prélèvement a été fait. Les souches 11 et 12 proviennent également d'un même patient immunodéprimé ayant subi un traitement avant que le parasite ne resurgisse, un an plus tard.

Les parasites ont été isolés dans du milieu Novy, McNeil and Nicolle (NNN) et cultivés à grande échelle à 27°C dans un milieu NNN + RPMI 1640, lequel contient 10% de « sérum fœtal inactivé », 80U/ml de pénicilline et 80µg/ml de streptomycine.

Les parasites sous forme promastigote ont ensuite été isolés par une centrifugation à 2000g pendant 10 minutes, à 4°C. Le culot est ensuite rincé avec du NaCl 0.3 %, avant de subir une deuxième centrifugation, avec les mêmes paramètres que la première. Le culot est ensuite rincé avec du PBS et centrifugé à nouveau; cette étape est répétée 3 fois. Le culot est finalement suspendu dans 1.5ml de PBS et transféré dans un tube eppendorf, lequel est centrifugé à 13000rpm à 4°C pendant 10 min. Le surnageant est alors éliminé et les parasites dans le culot sont stockés à -70°C.

L'ADN génomique est isolé par une précipitation au phénol/chloroforme :
Le stock de parasite purifié est suspendu dans 500µl d'un tampon de réaction, composé de 10mM EDTA, 100mM TRIS/HCl pH 7.5 et 100mM NaCl. A cette solution est ajouté du SDS 1% et de la protéinase K, 1mg/ml (concentrations finales). Le mix est laissé à 55°C pendant 2h et est agité tous les quart d'heure. Après cette première incubation, on ajoute de la RNase de manière à avoir une concentration finale de 100µg/ml. La solution est ensuite incubée une seconde fois, 1h à 50°C. On ajoute alors à la solution 600µl d'un mix Phénol/Chloroforme/alcoolisoamyl dans un rapport de 25 :24 :1. Les phases sont séparées par centrifugation à 13000 tours/min. à 4°C, pendant 10 minutes. La phase aqueuse est récoltée et l'opération est répétée deux fois. Une fois toute la phase aqueuse récupérée, on y ajoute 1/10 du volume d'acétate de sodium 3M, pH 5.2, et 2.5 volumes d'éthanol glacial 96% et on laisse précipiter à -20°C toute une nuit. Après la précipitation, on centrifuge la solution à 13000 Tours/min. à 4°C pendant 10 minutes, à la suite de quoi l'éthanol est éliminé, le tube est rincé à l'éthanol 70% puis séché et l'ADN purifié est suspendu dans 200µl d'eau.

2. PCR-RFLP.

L'ADN génomique des 25 souches a été soumis à l'amplification de deux séquences connues pour être variables dans le genre *Leishmania* : la glycoprotéine 63 (GP63) et la cystéine protéinase B (CPB). De plus ces gènes sont en tandem (répétés) dans le génome.



Fig. 1 : Carte de l'Espagne, on peut y voir la localisation de Majorque et Ibiza et leur situation par rapport à Madrid. Ref. : <http://www.maps.com>

Table 1. Souches de *Leishmania infantum* MON-1 utilisées.

N°	Patient	Code espagnol	Echantillon	Origine géographique	Remarques
1	ARZ	LLM-984	Humain (MO)	Madrid	(LV), HIV-, Greffe du foie
2	AMJ	LLM-983	Humain (MO)	Madrid	(LV), HIV+
3	OSR	LLM-980	Humain (GL)	Madrid	(LV), HIV-
4	ARJ	LLM-1181	Humain (MO)	Madrid	(LV), HIV+
5	ARJ	LLM-1212	Humain (MO)	Madrid	(LV), HIV+, Rechute
6	MAPG	LLM-1166	Humain (MO)	Madrid	(LV), HIV+
7	Milt-3	LLM-1006	Canin (MO)	Madrid	
8	Milt-4	LLM-1014	Canin (MO)	Madrid	
9	Milt-6	LLM-1037	Canin (MO)	Madrid	
10	Milt-7	LLM-1040	Canin (MO)	Madrid	
11	BGR	LLM-981	Humain (MO)	Majorque	(LV), HIV+, Rechute
12	BGR	LLM-1122	Humain (MO)	Majorque	(LV), HIV+,
13	RHC	LLM-1048	Humain (MO)	Majorque	(LV), HIV+
14	RJHC	LLM-1049	Humain (MO)	Majorque	(LV), HIV+
15	SDF	LLM-1150	Humain (P)	Majorque	(LC), HIV+
16	PCB	LLM-1109	Humain (MO)	Majorque	(LV) ? ?
17	Milt-1	LLM-1008	Canin (MO)	Majorque	
18	Milt-2	LLM-1007	Canin (MO)	Majorque	
19	Milt-5	LLM-1006	Canin (MO)	Majorque	
20	EI-35-G	LLM-1149	Canin (GL)	Ibiza	
21	EI-67-M	LLM-1155	Canin (MO)	Ibiza	
22	EI-92-M	LLM-1203	Canin (MO)	Ibiza	
23	EI-97-G	LLM-1139	Canin (GL)	Ibiza	
24	EI-147-G	LLM-1141	Canin (GL)	Ibiza	
25	EI-189-M	LLM-1158	Canin (MO)	Ibiza	

LV : Leishmaniose viscérale ; LC : Leishmaniose Cutanée ; MO : Moëlle Osseuse ; GL : Ganglions Lymphatiques ; P : Peau. Souches 4/5 et 11/12: cas de rechute chez un même patient.

A. Amplification de la séquence intragénique de GP63.

Deux amorces spécifiques à des régions conservées de la GP63 chez le complexe *donovani* et chez *L. major* ont été utilisées pour amplifier une séquence de 1.3 kb : SG1 (5'GTCTCCACCGAGGACCTCAACCA 3') et SG2 (5'TGATGTAGCCGCCCTCCTCGAAG 3') (Guerbouj *et al.*, 2001).

Le mix de réaction, d'un volume final de 50µl, contient : du tampon de réaction de l'enzyme 1X, 1mM de MgCl₂, 400nm de dNTPs, 20pm de chaque amorce, 1.5 unité de Taq polymérase (Silverstar eurogentec) et 20 ng d'ADN génomique.

L'ADN a ensuite été amplifié via un thermocycler PTC-100, avec le protocole suivant : une première dénaturation de 4 minutes à 90°, suivi de 30 cycles comprenant 1 minute à 94° (Dénaturation), 1.5 minute à 69° (Hybridation des amorces) et 2 minutes à 72° (Elongation). Le protocole d'amplification se termine par une élongation finale de 8 minutes

B. Amplification de la séquence intragénique de CPB.

On a amplifié une séquence d'approximativement 1kb de la région intragénique de CPB au moyen de deux amorces spécifiques des extrémités de la séquence codante de la CPB : CPBFOR (5'CGAACTTGCAGCGCAACCT 3') et CPBREV (5'CAGCCCAGGAAAGCAA 3') (Quispe *et al.*, 2004.). Pour cette réaction, chacun des 25 tubes contenait du tampon de réaction 1X, 0.75mM de MgCl₂, 400nm de dNTPs, 20pm de chaque amorce, 2.5 unités de Taq polymérase (Eurogentec Silverstar) et 20ng d'ADN de *Leishmania* ; pour un volume final de 50µl.

L'amplification de la séquence s'est faite par une dénaturation initiale de l'ADN à 95° pendant 5 minutes, suivi de 35 cycles composés des trois étapes suivantes : 30 secondes de dénaturation à 95°, 1 minute pour l'hybridation des amorces à 53°, et 1 minute d'élongation à 72°. Les cycles sont suivis par une élongation finale de 10 minutes.

C. Amplification de la séquence intergénique de CPB.

La région intergénique de CPB, d'une longueur d'1.4 kb, a été amplifiée, comme les séquences précédentes, au moyen d'amorces spécifiques trouvées par alignement des séquences de différentes espèces de *Leishmania* et le programme Primer Premier (Quispe *et al.*, 2004.). Les amorces utilisées sont PIGS 1A (5'CCTCATTGCTTTGGTCCTGG 3') et PIGS 2B (5'GGCGTGCCACGTATATCGC 3'). Le mix de réaction de 50µl contient du tampon de réaction 1X, du MgCl₂ 0.75mM, 400nm de dNTPS, 20 pm de chaque amorce, 2 unités de Taq Polymérase (Eurogentec Silverstar) et 20 ng d'ADN.

L'amplification de la séquence s'est ensuite faite par une dénaturation à 95° pendant 5 minutes, ensuite 34 cycles de 30 secondes à 95°C, 1 minute à 55° et 2.5 minutes à 72° et enfin une élongation finale par 10minutes à 72°C.

Les trois Amplification PCR ont chacune été faites deux fois pour chaque échantillon, afin d'avoir suffisamment de matériel pour la restriction, et tous les produits PCR ont d'abord été testés sur un gel d'agarose 1% (5µl de produit PCR par puits, 30 minutes de migration à 100V) avant de précipiter l'ADN.

D. Première précipitation à l'éthanol.

Les duplicats ont été mis en commun, et dans chaque tube a été ajouté : un volume d'eau pour atteindre 300µl, 30µl d'acétate de sodium 3M, pH=5.2, et 660µl d'éthanol absolu. Les solutions sont vortexées puis laissées à -20°C pour toute la nuit.

Après la précipitation les tubes sont centrifugés 15 minutes à 12000 Tours/min., et le culot est rincé avec 1ml d'éthanol 70%. Les tubes sont ensuite recentrifugés à 12000 Tours/min., et le culot est séché à l'air libre. Quand les tubes sont secs, on suspend l'ADN précipité avec 60µl d'eau. Les produits purifiés sont ensuite testés sur gel d'agarose (avec les mêmes conditions que pour les produits PCR) avant de subir les restrictions.

E. Restrictions enzymatiques.

Chacune des trois séquences amplifiées a été clivée par trois enzymes différentes : *Taq I*, *Hinc II* et *Mls I* pour GP63 ; *Taa I*, *Hinf I* et *Hae III* pour la séquence intragénique de la CPB ; et *Acy I*, *Hae II* et *Hae III* pour la séquence intergénique de la CPB.

Pour chaque restriction, le volume total dans chaque tube est de 20µl, et les solutions de restriction contenaient chacune 2µl d'enzyme, 2µl de tampon approprié (Voir Table 2.), et 16µl de produit PCR concentré. Les tubes sont ensuite placés dans un bain à la température appropriée toute une nuit.

Le lendemain, la restriction est arrêtée par l'ajout de 2µl d'EDTA 0.5M. Les produits de restrictions sont ensuite précipités par le même protocole que la première précipitation, puis resuspendus dans 5µl d'eau et placés à -20°C en attendant l'analyse des profils de restrictions avec le Bioanalyzer (Kit DNA 1000, protocole de la firme) .

Table 2. Données des enzymes de restriction utilisées.

Enzyme	Séquence reconnue (5'→3')	T° optimale	Tampon approprié	Concentration	Firme
<i>Acy I</i>	GR^CGYC	37°C	R+	10U/µl	MBI Fermentas
<i>Hae II</i>	RGCGC^Y	37°C	Y+/TANGO	10U/µl	MBI Fermentas
<i>Hae III</i>	GG^CC	37°C	R+	10U/µl	MBI Fermentas
<i>Hinc II</i>	GTY^RAC	37°C	Y+/TANGO	10U/µl	MBI Fermentas
<i>Hinf I</i>	G^ANTC	65°C	R+	10U/µl	MBI Fermentas
<i>Mls I</i> (<i>Msc I</i>)	TGG^CCA	37°C	R+	5U/µl	MBI Fermentas
<i>Taa I</i>	CAN^GT	65°C	Y+/TANGO	10U/µl	MBI Fermentas
<i>Taq I</i>	TCG^A	65°C	Taq I+	10U/µl	MBI Fermentas
<i>Rsa I</i>	5' GT^AC 3'	37°C	Inconnu	inconnu	inconnu

N= A,T,G ou C ; Y= C ou T ; R= G ou A.

3. RAPD.

Pour cette manipulation, nous avons commandé 6 amorces décarnériques qui ont montré du polymorphisme au sein du zymodème MON-1 (Hide, 2001). Ces amorces, fournies par Eurogentec (Seraing), sont : U2 (5' CTGAGGTCTC 3'), R15 (5' GGACAACGAG 3'), F10 (5' GGAAGCTTGG 3'), B4 (5' GGACTGGAGT 3'), B10 (5' CTGCTGGGAC 3') et A1 (5' CAGGCCCTTC 3'). Les amorces, au départ lyophilisées, ont été suspendues dans 100µl d'eau, puis diluées en une solution stock de 250µM. Des séquences inconnues de l'ADN génomique des 25 souches de *Leishmania* ont été amplifiées aléatoirement au moyen de ces 6 amorces. Pour chaque amplification au moyen d'une amorce, le même protocole a été suivi.

Le mix PCR contient, pour un volume final de 60µl du tampon de réaction de l'enzyme 1X, du MgCl₂ 1,5mM, 12pm de l'amorce RAPD, 100 µM de dNTPs, 0.9 Unités de Taq polymérase (Eurogentec silverstar), et 20 ng d'ADN génomique.

Le cycle d'amplification est aussi identique pour toutes les amorces utilisées : dénaturation à 94°C pendant 5', ensuite 45 cycles d'amplification faits d'1 minute de dénaturation à 94°C, 1 minute d'hybridation à 36°C, 1 minute d'élongation à 72°C. Après ces cycles, on termine par une dernière élongation de 7 minutes.

Pour chaque amorce, tous les échantillons ont été fait en triplicats, afin de vérifier la reproductibilité de la méthode. Pour avoir les résultats les plus reproductibles possibles, les mixs se sont tous faits avec les mêmes réactifs (même firme) et les nombreuses PCR se sont toutes faites sur la même machine.

Après l'amplification, les profils RAPD sont résolus par électrophorèse ; on charge 15µl de produits PCR sur gels d'agarose 2%, et la migration se fait par un courant de 60 Volts (3V/cm) (Brisse, 1997), pendant 5 heures. Les différentes bandes sont ensuite révélées par un bain de trente minutes dans une solution de bromure d'éthidium (1µg/ml) et une exposition au U.V.

Les profils d'amplifications ont ensuite été observés. Dans ceux-ci, nous n'avons considérés que les bandes bien visibles et présentes dans les trois amplifications d'un même triplicat.

4. Mesure de la concentration d'ADN par spectrophotométrie.

La RAPD étant très sensible à la concentration en ADN dans le mix et ne connaissant pas la concentration des solutions stocks d'ADN de *Leishmania* ; il a fallu déterminer la quantité d'ADN présente dans ces tubes. La concentration d'ADN a été mesurée par spectrophotométrie avec un spectrophotomètre Genesys 10 U.V. A partir de l'absorbance à 260 nm de dilution des solutions stocks, on a pu déterminer la concentration en ADN par la formule :

$$\text{Concentration } (\mu\text{g/ml}) = \text{abs}_{260\text{nm}} * \text{Dilution} * 50.$$

Des dilutions d'ADN 10ng/µl ont été préparées pour les RAPD à partir des solutions stocks de concentrations maintenant connues.

5. Analyse des données.

Les profils RFLP et RAPD ont été convertis en matrices disjonctives dans lesquelles chaque bande est caractérisée par sa présence (1) ou son absence (0) dans les 25 souches.

Ces matrices ont ensuite été analysées par les programmes de phylogénie Phylip, disponibles gratuitement sur Internet (<http://evolution.genetics.washington.edu/phylip.html>). Les programmes utilisés sont :

-Restdist : à partir des données brutes (les matrices) ce programme crée un tableau des distances entre tous les échantillons. Ces distances sont calculées par la formule de Nei et Li (1979), spécialement conçue pour analyser les données provenant de restrictions de séquences par endonucléases. Cette formule tient compte, à partir de la taille des sites, des probabilités d'apparition et de disparitions des sites de restrictions (Nei et Li, 1979).

-Neighbor : à partir des matrices de distances construites par RESTDIST, ce programme va ordonner les différentes souches au moyen de l'algorithme UPGMA (Unweighted Pair Group Method using Arithmetic Averages) qui va créer une classification hiérarchique ascendante :

- Le programme va chercher dans la matrice de distances la distance la plus faible entre 2 souches i et j (d_{ij}).
- Un premier groupe (u) contenant i et j va être formé, et le niveau du nœud va être déterminé par $d_{ij}/2$.
- Les distances entre le nouveau groupe u et les autres souches sont calculées. Dans le cas de UPGMA, le calcul des nouvelles distances tient compte du nombre de souches dans chaque groupe formé : si le groupe u nouvellement formé rassemble les groupes i (contenant T_i souches) et j (contenant T_j souches), alors les distances entre u et les autres souches sont déterminées par :

$$d_{ku} = (T_i \cdot d_{ki} + T_j \cdot d_{kj}) / (T_i + T_j)$$

- A partir de cette nouvelle matrice, le programme retourne à la première étape. La plus petite distance est repérée et les souches (ou groupes) qu'elle lie sont rassemblés....

On obtient au final une structure liant toutes les souches selon leurs distances (Swofford, Olsen, Waddels et Hillis, 1996).

-Drawgram : ce programme va partir des résultats de NEIGHBOR et transcrire les groupements réalisés sous forme d'arbre phénétiques (phénogramme).

-Seq boot : la robustesse des groupements observés dans les arbres a été vérifiée de manière statistique au moyen du bootstrap : l'idée est que si deux ou plusieurs souches sont bien regroupées dans une clade, de faibles variations des états de caractères ne doivent pas changer ces regroupements. Des matrices modifiées aléatoirement sont donc créées par le programme SEQBOOT. mille nouvelles matrices sont faites, dans chacune de celles-ci une colonne est changée par rapport à la matrice d'origine. L'ensemble des matrices modifiées est analysé avec RESTDIST et NEIGHBOR. Le résultat final est un arbre où à chaque nœud est indiqué

le nombre de fois que ce groupe a été trouvé dans les 1000 arbres aléatoires. Plus cette valeur est élevée, plus la robustesse de ce groupe est grande.

Nous avons utilisé ces programmes pour dessiner des arbres à partir des résultats de nos marqueurs PCR-RFLP et RAPD pour les 25 souches espagnoles. Nous avons également dessiné des arbres à partir des résultats PCR-RFLP combinés :

- aux résultats obtenus avec une restriction du kDNA pour ces mêmes souches (données reçues de Madrid).
- Aux résultats obtenus avec les mêmes marqueurs PCR-RFLP pour 15 autres souches du complexe *donovani* (voir Table 3), préalablement étudiées dans le cadre du projet de génotypage (Quispe *et al.*, 2004.). Ces espèces ont été définies à l'université de Montpellier II, au moyen de la méthode isoenzymatique (Communication personnelle).

Table 3. Souches du projet de génotypage, représentantes du complexe *L. donovani*, comparées au souches Espagnoles.

Code	Souche	Espèce	Origine	Zymodème	Maladie
LG 1	MHOM/FR/1978/LEM75	<i>L. infantum</i>	France	MON-1	
LG 2	MHOM/FR/1995/LPN114 (LEM3001)	<i>L. infantum</i>	France	MON-1	
LG 3	MHOM/ES/1993/PM1 (LEM2608)	<i>L. infantum</i>	Espagne	MON-1	
LG 4	MHOM/FR/1997/LSL29 (LEM3420)	<i>L. infantum</i>	France	MON-1	LC
LG 5	MHOM/ES/1986/BCN16 (LEM1078)	<i>L. infantum</i>	Espagne	MON-1	LC
LG 6	MHOM/PT/2000/IMT260 (LEM3975)	<i>L. infantum</i>	Portugal	MON-1	LC
LG 7	MHOM/FR/1996/LEM3249	<i>L. infantum</i>	France	MON-29	LC
LG 8	MHOM/ES/1991/LEM2298	<i>L. infantum</i>	Espagne	MON-183	
LG 9	MHOM/IN/0000/DEVI (LEM138)	<i>L. donovani</i>	Inde	MON-2	
LG 10	MHOM/IN/1996/THAK35 (LEM3178)	<i>L. donovani</i>	Inde	MON-2	
LG 11	MHOM/ET/1972/GEBRE 1	<i>L. archibaldi</i>	Ethiopie	MON-82	
LG 12	MHOM/SD/1982/GILANI	<i>L. infantum</i>	Soudan	MON-30	
LG 13	MHOM/ET/0000/HUSSEN	<i>L. donovani</i>	Ethiopie	MON-42	
LG 14	MHOM/FR/1980/LEM189	<i>L. infantum</i>	France	MON-11	
LG 15	MHOM/MT/1985/BUCK	<i>L. infantum</i>	Malte	MON-78	

LC : Leishmaniose cutanée.

III

Résultats et discussion

1. Souches utilisées.

Les souches étudiées ici sont les 25 échantillons espagnols de *L. infantum* zymodème MON-1 reçues dans le cadre du projet de génotypage, dont les différentes caractéristiques sont détaillées dans la partie « Matériel et Méthodes »

2. PCR-RFLP.

A. PCR-RFLP utilisées

Trois PCR développées à l'Institut de Médecine Tropicale (Instituut voor Tropische geneeskunde, ITG) et qui amplifient respectivement un fragment intragénique de la GP63, un fragment intragénique de la CPB (CPB intra) et une séquence intergénique de la CPB (CPB inter) ont été utilisées sur l'ADN génomique des 25 souches de *Leishmania infantum* étudiées (Quispe *et al.*, 2004). Pour chacune de ces amplifications, trois enzymes de restriction ont été utilisées. Celles-ci ont été préalablement sélectionnées sur base de prédictions de polymorphisme de sites de restrictions faites *in silico* à partir de séquences disponibles (Quispe *et al.*, 2004. ; communication personnelle). Le pouvoir de résolution de ces marqueurs a déjà été testé, les amplifications des séquences de la CPB sont positives jusqu'à une dilution de 10^2 parasites/ml ; l'amplification de la GP63 est légèrement moins sensible, l'amplification ne marche pas avec des concentrations inférieures à 10^3 parasites/ml (Quispe *et al.*, 2004. ; communication personnelle).

Comme nos résultats sont l'analyse de la présence ou l'absence de bandes de faibles intensités, (parfois inférieures à 0.2 ng/ μ l), nous avons analysé ces différents profils à l'aide du Agilent 2100 Bioanalyzer, dont la sensibilité et le pouvoir de résolution sont supérieurs aux techniques habituelles d'électrophorèses sur gel d'agarose/visualisation au bromure d'éthidium (quispe *et al.* 2004).

Avant de caractériser la présence ou l'absence des bandes observées, il nous a fallu discriminer quelles étaient les bandes significatives à considérer lors de l'analyse et quelles étaient les bandes parasites à ne pas prendre en compte. Par manque de temps, la plupart des manipulations PCR-RFLP n'ont pas pu être répétées, nous avons seulement procédé à de nouvelles PCR dans le cas de digestions incomplètes.

En général, tous les fragments de restrictions visibles à l'oeil et détectés par la machine ont été considérés quelque soit leur intensité. Pour chaque locus étudié, il a été démontré préalablement que différents isogènes sont présents en nombre de copies différentes, ce qui explique les différences d'intensités observées en PCR-RFLP. Un indice de cette organisation en copies est que la somme de tous les fragments trouvés dans une migration est généralement un multiple de l'amplicon de départ (K. Victoir *et al.*, 1998 ; S. Guerbouj *et al.*, 2001).

D'autres bandes de tailles diverses et souvent d'aspect très net apparaissent dans certaines migrations. Les bandes de ce type n'ont pas été considérées dans l'analyse. Ces traces nettes étant la marque caractéristique d'un artefact, de particules étrangères présentes dans le gel de migration, elles présentent aussi un pic de densité optique (D.O.) tout à fait particulier : très étroit et suivi d'une vallée sous le seuil zéro. De plus, par prudence nous n'avons jamais comptabilisé les bandes présentes en dessous de 80 pb, car les bandes de cet ordre de taille peuvent provenir non seulement de restrictions des séquences cibles, mais il peut également s'agir de dimères issus de l'hybridation des amorces entre elles, déjà trouvés dans les produits PCR avant les restrictions. Cette zone du profil de restriction risquant

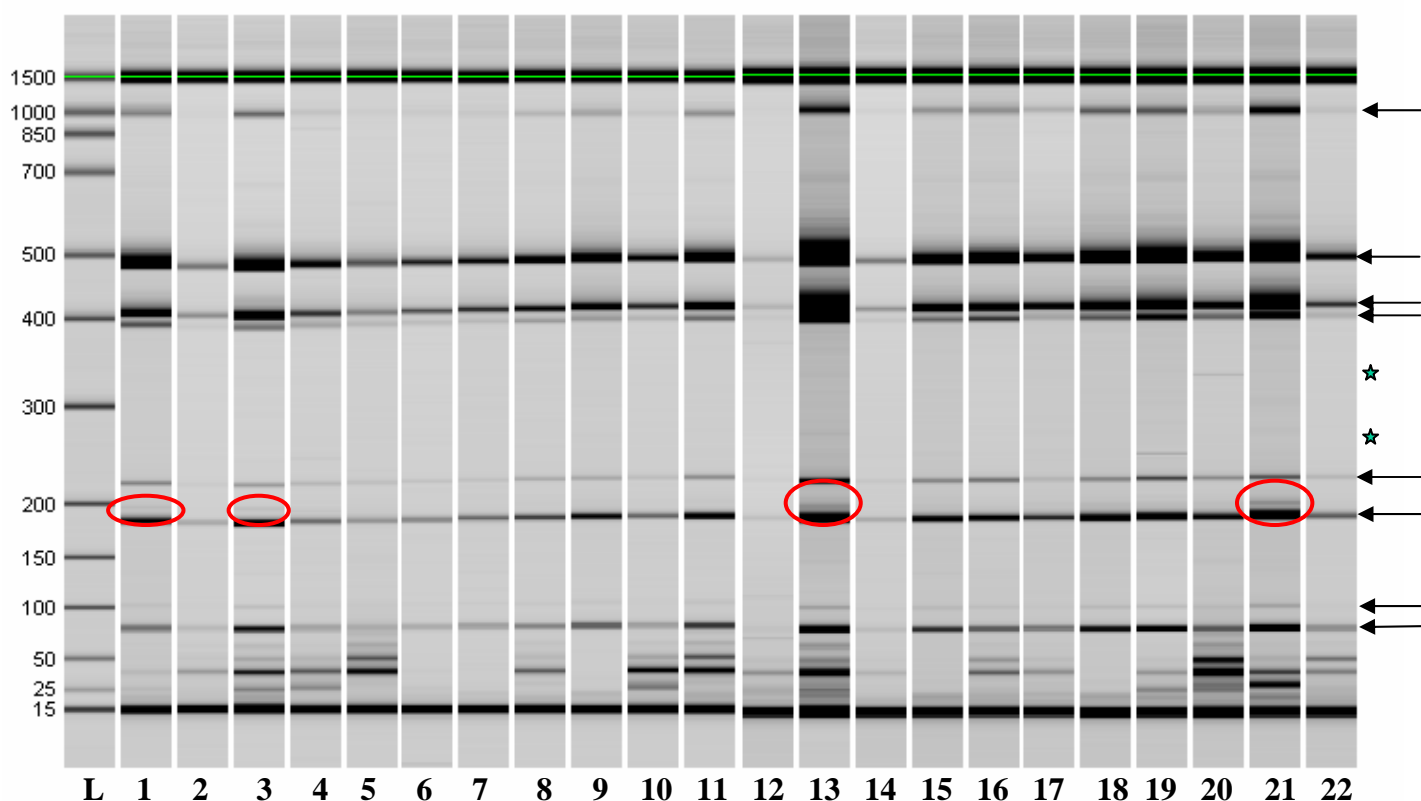


Fig 1.: Aspect général du profil de restriction de la GP63 par l'endonuclease *Taq I*. (aperçu non exhaustif)

Les bandes présentes dans tous les échantillons sont indiquées par des flèches. Certaines bandes comme l'avant-dernière, d'une taille approximative de 100 pb, est d'une intensité faible, et n'apparaît pas partout en impression. Cependant, elle est visible chez tous les isolats, sur le PC. Les étoiles indiquent les endroits où sont trouvés des artéfacts causés par des impuretés dans le gel électrophorétique. Les cercles montrent les régions où un fragment spécifique (196 pb) est observé chez 4 isolats.

d'induire du faux polymorphisme, la présence de dimères pouvant varier d'un échantillon à l'autre. Nous avons préféré ne pas tenir compte de ces bandes dans les analyses. Enfin, tous les électrophénogrammes ont été analysés par deux observateurs, et le consensus des deux lectures considéré pour le traitement des données. En procédant ainsi, on a réduit le risque de mauvaises interprétations autant que possible. Cependant, une vérification des données est toujours envisageable.

B. Analyse des résultats.

Quatre marqueurs sur les neuf utilisés dans l'analyse des 25 souches se sont montrés monomorphes (profil identique pour les 25 souches étudiées) : GP63/*HincII*, GP63/*MlsI*, CPB Intra/*TaaI* et CPB Inter/*AcyI*.

Les 5 autres marqueurs montrent du polymorphisme, qui permet de différencier plusieurs souches du zymodème MON-1 :

- GP63/ *Taq I* : 2 génotypes différents.
- Cpb intra/ *Hinf I* : 2 génotypes différents.
- Cpb Intra/ *Hae III* : 5 génotypes différents.
- Cpb Inter/ *Hae III* : 4 génotypes différents.
- Cpb inter/ *Hae II* : 11 génotypes différents.

B.1 : Restriction de la séquence de la GP63.

Le produit d'amplification de la séquence intragénique de la GP63, d'une taille initiale d'1.3 kb (S. Guerbouj *et al.*, 2001) a montré du polymorphisme suite à une restriction avec l'enzyme *Taq I*.

Le profil de restriction de ce couple séquence/enzyme montre - en dehors des marqueurs destinés à l'alignement- 8 bandes présentes dans tous les échantillons. Ces bandes, d'intensités variables, ont des tailles allant de 80 à 1000 pb (voir Fig. 1).

Un certain polymorphisme peut aussi être aperçu dans les plus petits fragments. Mais toutes les bandes présentes en dessous de 80 pb n'ont pas été prises en compte dans l'analyse, c'est en effet dans cette zone du gel que se retrouvent les séquences d'ADN telles que les dimères, des produits d'hybridation non spécifiques. Ces fragments n'ont donc pas été comptés, pour ne pas avoir des résultats faux positifs.

Le seul polymorphisme observé au niveau de cette séquence se présente sous la forme d'une seule bande de 196 pb, d'intensité assez faible. Cette bande n'est présente que dans 4 échantillons seulement (1, 3, 13 et 21).

B.2 : Restriction de la séquence intragénique de la CPB.

Les produits d'amplifications des séquences codantes de la CPB sont de 1 kb environ. Après restriction avec l'enzyme *Hinf I*, 6 bandes à partir de 560 pb ont été observées dans les 25 souches étudiées (Voir Fig. 2). Le dernier fragment à avoir été pris en compte dans l'établissement de la matrice est celui de 115 pb, en raison des produits de dimères plus bas

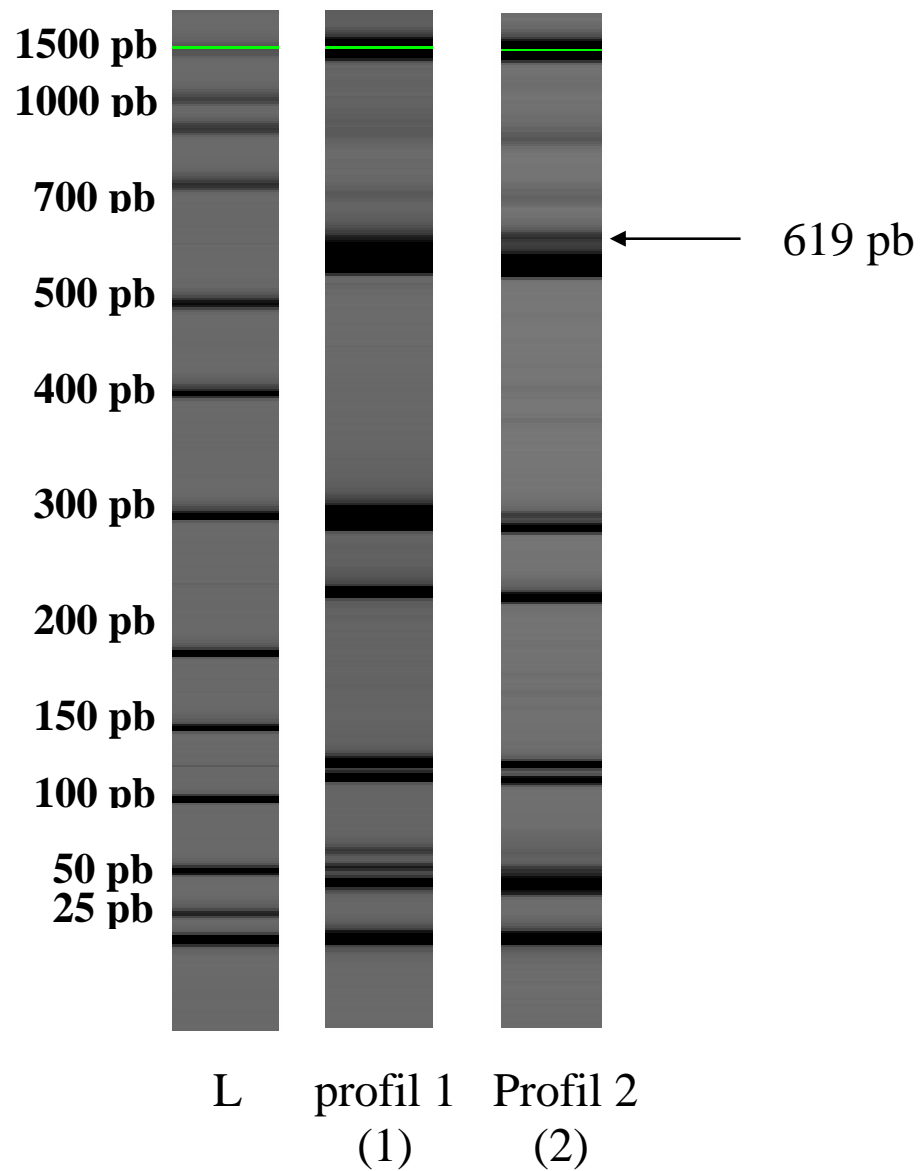


Fig. 2 : Polymorphisme et génotypes trouvés au moyen du Marqueur CPB intra/ *Hinf I*. Ici aussi, il n'y a qu'une bande polymorphe, une bande assez intense de 619 pb. Les bandes supérieures à celle-ci n'ont pas été comptées car il pourrait s'agir de restrictions incomplètes. De même les bandes inférieures à 100 pb ont également été écartées de l'analyse, en raison du risque qu'il s'agisse de dimères et non de fragments de restrictions.

dans le gel. Un fragment spécifique a été observé chez certaines souches : 619 pb. Les deux génotypes trouvés sont caractérisés par la présence ou l'absence de cette bande.

Les restrictions réalisées au moyen de l'enzyme *Hae III* montrent un profil général de 6 bandes correspondant à d'assez petits fragments : de 98 à 260 pb. Les bandes variables sont : un doublet de taille supérieure aux bandes constantes, de 290 et 284 pb, présents dans une majorité d'échantillons ; un fragment de 278 pb, présent uniquement chez la souche 3. A cela s'ajoute une bande de 184 pb, plus rarement présente, ainsi qu'un autre fragment de 173 pb (Voir Fig. 3).

B.3 : Restrictions de la séquence intergénique de la CPB.

Le produit d'amplification de la variation intergénique de la CPB est de 1.6 kb (Quispe *et al.*, 2004). Deux enzymes ont montré du polymorphisme.

Le profil de restriction par *Hae III* se présente sous la forme générale de 7 fragments de tailles et d'intensités très variées (de 610 à 84 pb). En plus de ces 7 fragments génériques, cette restriction révèle du polymorphisme au niveau de 4 fragments proches dans le profil, de 333 à 299 pb. Ces bandes permettent de différencier les 25 souches en 4 génotypes (voir Fig. 4).

Les profils les plus polymorphiques ont été trouvés avec la CPB inter et l'enzyme *Hae II*. En plus des 6 fragments constants de part et d'autres des souches étudiées, de 650 à 110 pb, 11 génotypes ont été dénombrés sur base de la présence/absence de 9 bandes de faibles intensités, situées entre autres à 718, 689, 404 et 395pb (voir Fig. 5).

C. Analyse phénétique du polymorphisme observé.

L'ensemble des profils de restrictions obtenus ont été utilisés pour construire un arbre phénétique (un phénogramme). Les 25 souches étudiées se répartissent en 3 clades dans l'arbre, parmi lesquelles, 22 génotypes différents peuvent être distingués. (voir Fig. 6). Les souches présentes dans ces 3 groupes sont les mêmes que celles qui montraient un profil identique suite à la restriction intergénique de la CPB avec l'enzyme *Hae III* (à l'exception de la souche 3, incluse dans la deuxième clade alors qu'elle présentait un profil unique avec le marqueur CPB inter/*haeIII*).

Les valeurs bootstrap sont représentées en pourcentages sur les différents nœuds de l'arbre. Les valeurs associées à l'analyse de l'arbre sont faibles : La plus haute valeur obtenue est de 68,4% (pour la clade A). Or, on considère habituellement qu'un groupe est robuste à partir d'une valeur de bootstrap de 80% (communication personnelle). Le manque de robustesse observé au niveau des différentes branches peut s'expliquer par la petite quantité de caractères discriminant les 25 souches (par exemple, les souches 15 et 18 ne se distinguent l'une de l'autre que par un seul fragment présent chez l'échantillon 15 et absent chez 18). Ce manque de caractères n'est pas surprenant, attendu que nous avons travaillé avec des souches de *Leishmania* extrêmement proches l'une de l'autre : ces souches appartiennent à la même espèce, font partie du même zymodème et viennent d'une même zone géographique. La structure de l'arbre en 3 clades devrait être vérifiée par d'autres marqueurs ; nous avons cependant examiné si des informations épidémiologiques pouvaient être inférées des tendances démontrées par le phénogramme (Voir table 1.).

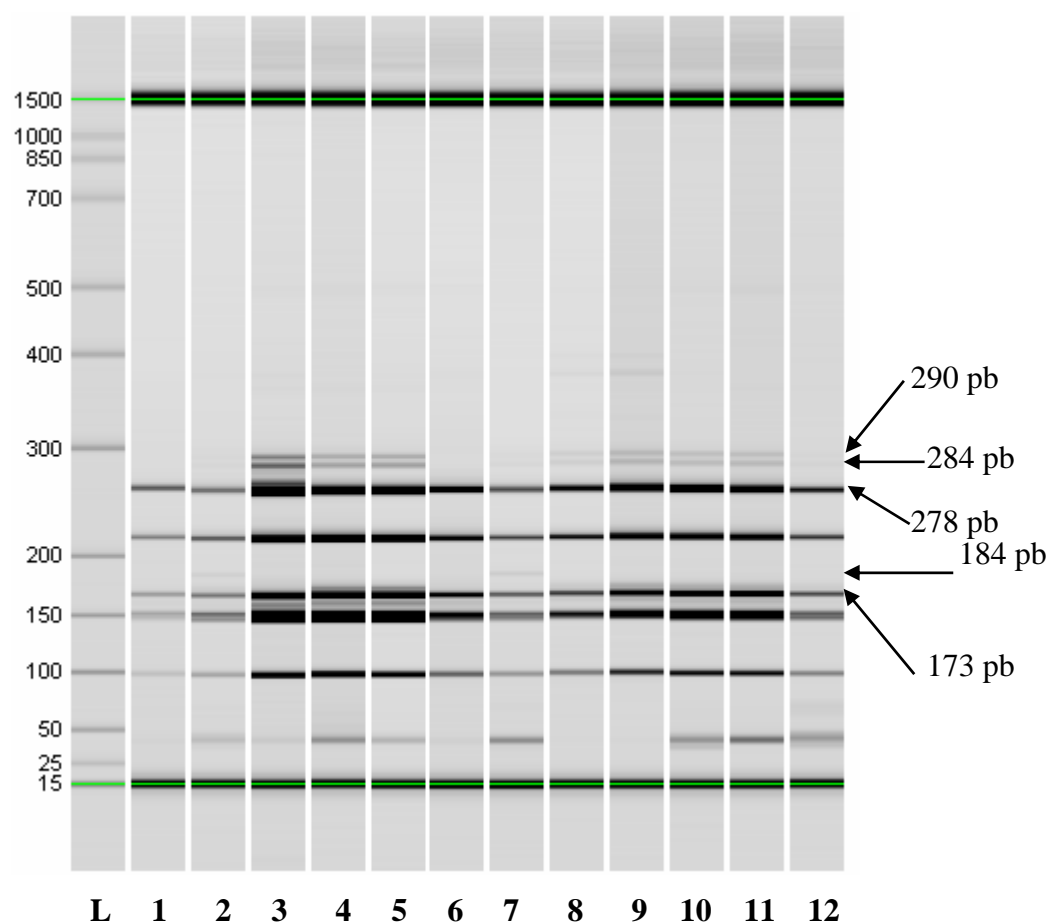


Fig 3 : Polymorphisme et génotypes trouvés avec la restriction de CPB intra par l'endonucléase *Hae III*. Le polymorphisme s'exprime sous la forme de cinq fragments dont la présence n'est pas constante dans les 25 souches : un doublet de 290 et 284 pb, liés dans l'absence ou la présence parmi les différentes souches ; un léger fragment à la hauteur de 278 pb, retrouvé uniquement dans le premier génotype ; et un fragment de 173 pb, accolé à une bande ubiquiste plus courte de 5 pb.

Les bandes situées en dessous de 100 pb, polymorphiques ou non, n'ont pas été employées pour l'élaboration de la matrice, en raison du risque que ces bandes soient des dimères issus des amorces.

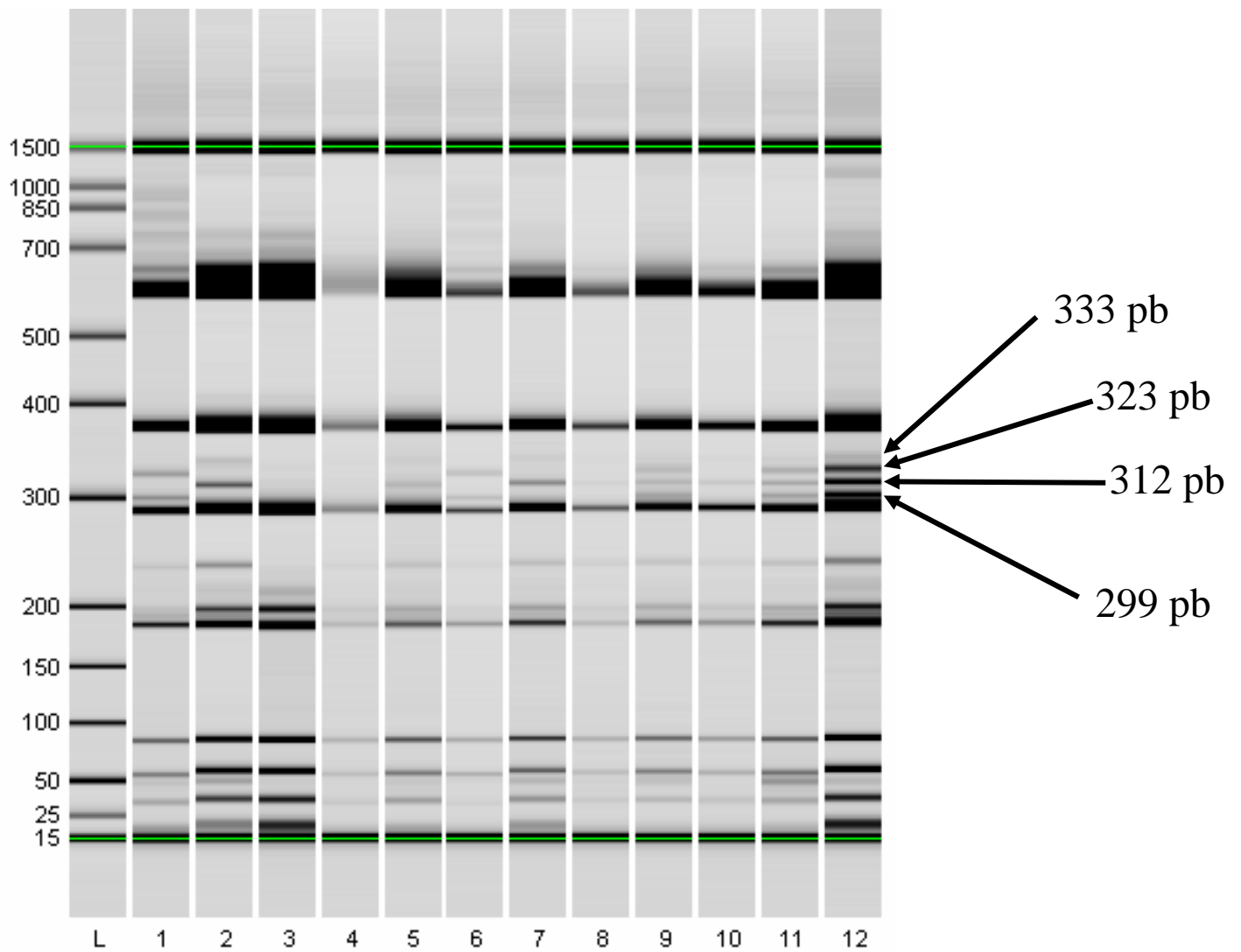


Fig 4 : Polymorphisme montré par la restriction de la séquence intergénique de CPB. Les quatre génotypes identifiés sont : présence des fragments de 323 et 299 pb (pistes 1 et 6) ; présence des fragments de 333 et 312 pb (pistes 2, 4, 5, 7 et 10), présence des 4 bandes (pistes 9, 11 et 12) et absence des 4 fragments (piste 3). L'échantillon 4 ne présente pas le même génotype que le numéro 3, cela a été vérifié par une seconde restriction avec de l'ADN en concentration normalisée (Résultat non montré).

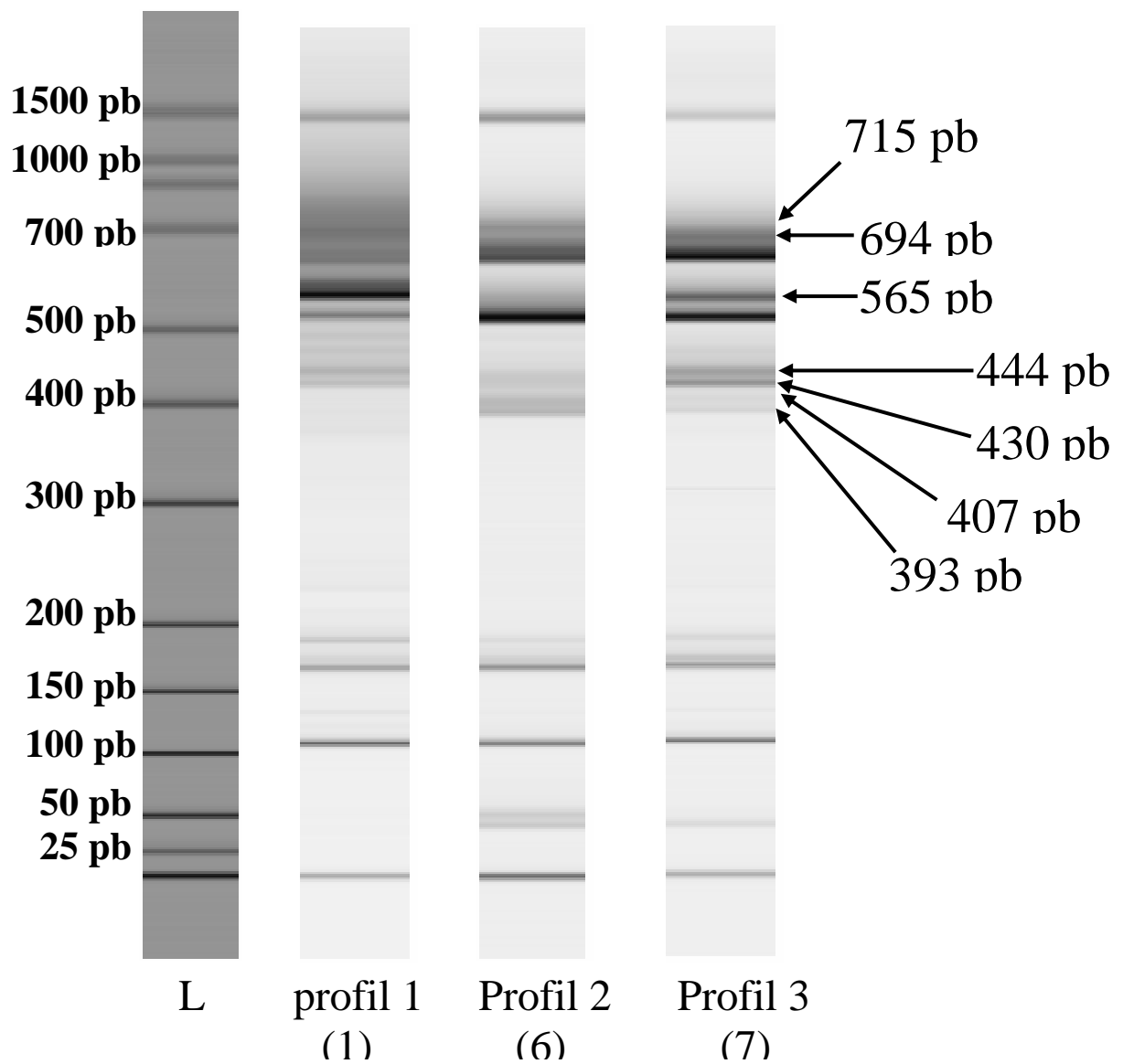


Fig. 5 : Exemple de polymorphisme trouvé par la restriction de la CPB inter au moyen de l'enzyme Hae II. Il existe d'autres bandes dont la présence varie ans les différents gel de l'échantillon, mais en raison de la très faible intensité de celles-ci (l'augmentation de contraste dissimulerait le polymorphisme plus important sur impression), et du grand nombre de génotypes différents, ces données ne sont pas montrées.

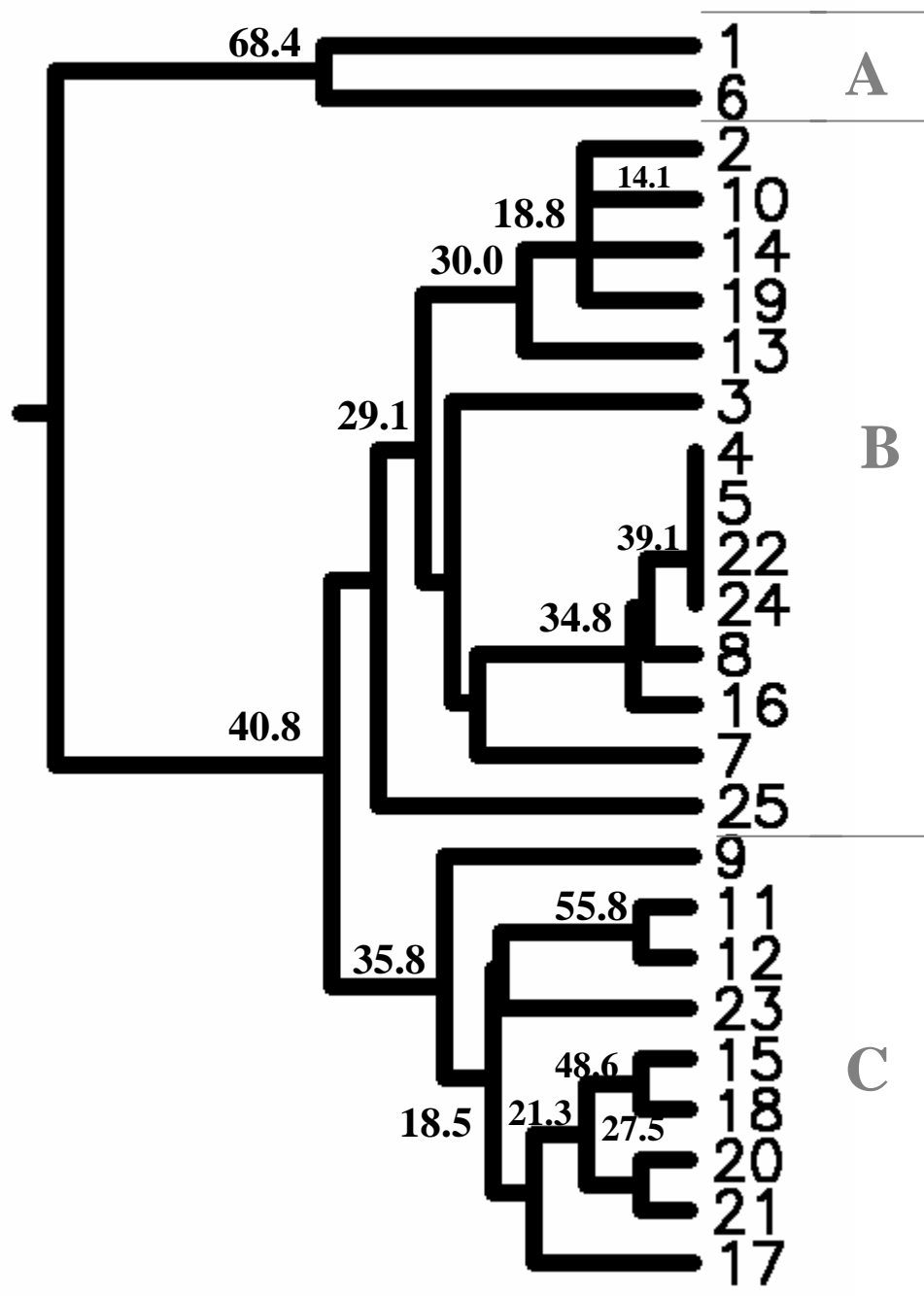


Fig. 6 : Phénogramme construit à partir des données PCR-RFLP. Les valeurs associées aux branches sont les bootstrap, exprimées en pourcentages à partir d'une analyse effectuée sur 1000 matrices aléatoires.

Table 1. Arbre PCR-RFLP des séquences d'antigènes. Décomposition des clades observés.

	A	B	C
Souches observées	1; 6. (2 souches)	2; 3; 4; 5; 7; 8; 10; 13; 14; 16; 19; 22; 24; 25. (14 Souches)	9; 11; 12; 15; 17; 18; 20; 21; 23. (9 Souches)
Origine géographique	Madrid.	Madrid : 7 Souches. (2; 3; 4; 5; 7; 8; 10) Majorque : 4 Souches. (13; 14; 16; 19) Ibiza : 3 Souches. (22 ; 24 ; 25)	Madrid : 1 Souche. (9) Majorque : 5 Souches. (11; 12; 15; 17; 18) Ibiza : 3 Souches. (20 ; 21 ; 23)
Hôte	Humain.	Humain : 7 Souches. (2; 3; 4; 5; 13; 14; 16) Canin : 7 Souches. (7; 8; 10; 19; 22; 24; 25)	Humain : 3 Souches. (11; 12; 15) Canin : 6 souches. (9; 17; 18; 20; 21; 23)
Forme clinique (Parmi les hôtes humains)	L.V.	L.V. : 7 Souches. (2; 3; 4; 5; 13; 14; 16)	L.V. : 2 Souches. (11; 12) L.C. : 1 Souche. (15)
Coinfection HIV (Parmi les hôtes humains)	HIV + : 1 Souche. (6) HIV - : 1 Souche. (1)	HIV + : 5 Souches. (2; 4; 5; 13; 14) HIV - : 1 Souche. (3) Inconnu : 1 Souche. (16)	HIV + : 3 Souches. (11; 12; 15)
Prélèvement des parasites	Moelle osseuse	Moelle osseuse : 12 Souches. (2; 4; 5; 7; 8; 10; 13; 14; 16; 19; 22; 25) Ganglions lymphatiques : 2 souches. (3; 24)	Moelle osseuse : 6 Souches. (9; 11; 12; 17; 18; 21) Ganglions lymphatiques : 2 Souches. (20; 23) Peau : 1 Souche. (15)
Remarques éventuelles	Souche 1 : immunosuppression du patient due à une greffe du foie.	Souches 4 et 5 : prélevées chez le même patient avant et après une rechute.	Souches 11 et 12 : prélevées chez le même patient après deux rechutes successives.

La répartition des souches dans les 3 clades du phénogramme montre une certaine structuration (géographique). La clade A, en effet, ne comprend que des souches Madrilènes mais on retrouve en proportions différentes des souches de cette région dans les deux autres clades. Par contre, la clade C est composé presque exclusivement de souches insulaires. L'échantillon de Majorque, dont les souches sont présentes dans les clades B et C, présente une situation intéressante : en effet, des souches humaines et canines de cette île sont présentes dans les deux clades, ce qui suggère l'existence de deux cycles de transmission dans cette île. Les sujets immunodéprimés sont, quand à eux, répartis dans tout l'arbre.

Une autre information épidémiologique intéressante concerne les souches isolées d'un même patient. Les souches 4 et 5, prélevées chez un même patient immunodéprimé, respectivement avant traitement et après une rechute, 4 mois plus tard (Cf. matériel et méthodes), ne peuvent être distinguées l'une de l'autre par nos marqueurs. Ce qui pourrait dire, dans l'état actuel de nos connaissances, que la rechute de ce patient provient de la recrudescence de la souche l'ayant infecté initialement et qui aurait été incomplètement éliminée par le traitement. Cependant il pourrait également s'agir d'une nouvelle infection par une autre souche, possédant le même profil avec les marqueurs étudiés, mais ceci semble peu probable. Dans l'échantillon actuel, les seules souches présentant le même génotype ont été isolées de chiens dans l'île d'Ibiza (les échantillons 22 et 24). Cependant, la taille de notre échantillon est trop petite pour conclure à un lien épidémiologique entre ces deux paires de souches.

Par contre, pour les souches 11 et 12, également originaires d'un même patient (Cf. Matériel et méthode), une différence au niveau du profil de restriction de la séquence intragénique de la CPB par *Hinf I* peut être observée et permet la distinction de ces deux souches. Ce changement observé dans la séquence codante pourrait venir d'une mutation de la séquence CPB de la souche 11, suivie d'une recrudescence de la nouvelle souche une fois achevé le traitement. Cependant, il peut également s'agir d'une infection mixte par les souches 11 et 12 dans laquelle la souche 11 aurait été dominante avant le traitement, suite à quoi la souche 12, peut-être plus résistante, aurait profité de la place maintenant libre pour se développer à son tour. Il peut être intéressant de tester chez ces deux souches la résistance intrinsèque aux agents anti-leishmaniens. Enfin, il pourrait s'agir d'une réinfection.

D. Comparaison du polymorphisme des souches espagnoles avec d'autres souches du complexe *L. donovani*.

La matrice des 25 souches espagnoles MON-1 a ensuite été combinée avec celle de 15 souches du complexe *L. donovani* (Cf. Matériel et Méthodes), préalablement étudiées au moyen des mêmes marqueurs (*Quispe et al.*, 2004). Ceci a été fait dans le but de situer le polymorphisme trouvé dans nos 25 souches espagnoles par rapport à celui trouvé dans le complexe *L. donovani* en entier.

Pour réunir les 2 matrices, et ainsi obtenir un arbre montrant le polymorphisme global du complexe *L. donovani*, nous avons agi de manière minimaliste : en effet, par faute de temps nous n'avons pas vérifié les co-migrations de certains caractères spécifiques rencontrés dans les deux échantillons, par migration sur un même gel. Les caractères concernés ont donc été supprimés de l'analyse. De cette manière, le polymorphisme final est peut-être sensiblement réduit, mais la structuration générale de l'arbre est plus correcte.

Dans l'arbre global obtenu (Voir Fig. 7), on observe d'abord une première distinction entre les souches de *L. infantum* et celles des autres espèces du complexe *L. donovani*,

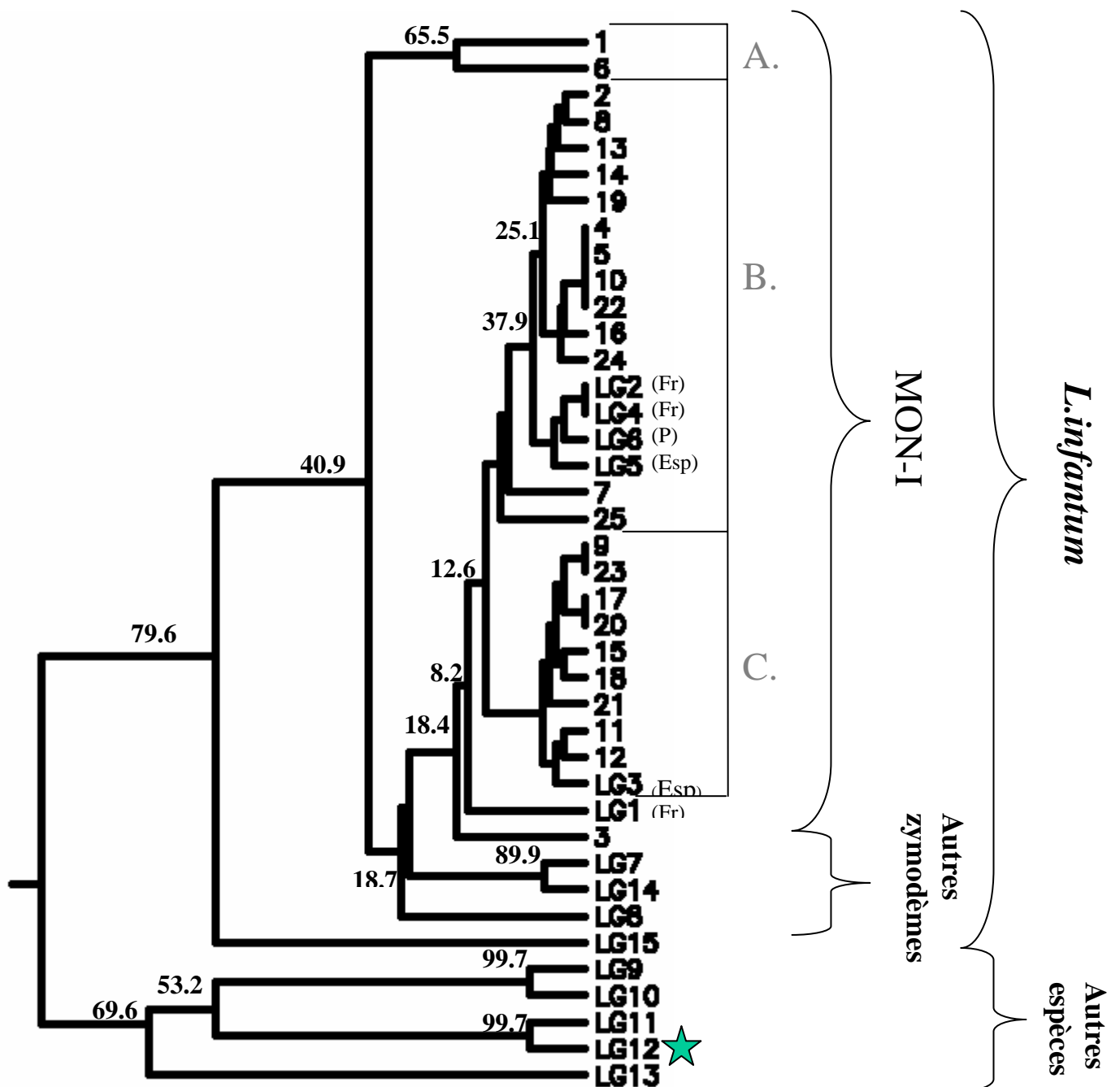


Fig. 7 : Structure et organisation de l 'arbre obtenu par la combinaison des résultats des marqueurs PCR-RFLP testés sur nos 25 souches espagnoles et 15 autres souches du complexe *L. donovani*.

Fr : France ; Esp : Espagne ; P : Portugal

Etoile : Souche Est- africaine typée comme *L. infantum* par la MLEE.

groupées dans une clade spécifique dès les premières branches de l'arbre. Cette clade possède toutefois un intrus : la souche LG 12 appartenant à *L. infantum*, mais présente dans la clade des souches de *L. archibaldi* et *L. donovani*. Il est à noter que ce zymodème Est-Africain est l'objet de controverses, de nombreux auteurs le présentant comme appartenant à *L. donovani* (Quispe *et al.*, 2004 ; Zemanova *et al.*, 2004).

Au sein de *L. infantum*, on constate que tous les isolats de MON-1 sont regroupés séparément des autres zymodèmes, à l'exception des isolats E1 et E6. Ceci suggère une structure polyphylétique du zymodème MON-1, ce qui a été montré par d'autres auteurs (Hide *et al.*, 2001)

Au sein du zymodème MON-1, la structuration des souches espagnoles a légèrement changé, en raison du plus petit nombre de caractères utilisés (les souches 9 et 23 sont maintenant réunies, les souches 2 et 8 sont beaucoup plus proches l'une de l'autre que dans le premier arbre) mais les 3 clades A-C sont toujours présentes. Les six nouvelles souches du zymodème MON-1 (LG 1 - LG 6) se sont insérées avec la majorité des MON-1 espagnoles. Une de ces 6 s'individualise à la base du groupe majeur de MON-1 (LG 1, d'origine française). La souche LG 3, venant d'Espagne, est regroupée dans la clade C. Les quatre autres souches (prélevées en France, en Espagne et au Portugal), n'appartenant pas à notre série de souches espagnoles sont regroupées dans un petit sous-groupe, au sein du clade B

A l'exception de quelques branches distinguant des populations géographiques de certaines espèces, par exemple LG 2 et LG 10, *L. donovani* d'Inde. Ou de zymodèmes différents (LG 7 et LG 14), les bootstrap observées sont toujours aussi faibles pour les 25 souches Espagnoles. C'est tout à fait normal d'avoir ces résultats après l'ajout des données des 15 souches du complexe *L. donovani*, puisqu'il n'y a pas eu d'ajout de caractères discriminants entre les 25 souches étudiées (on en a même enlevé pour permettre une fusion correcte des matrices). L'arbre nous présente une structure inter- et intraspécifique pour le complexe *L. donovani*. Cette structure ne s'accorde pas parfaitement avec celle des marqueurs isoenzymatiques : en effet, contrairement à la MLEE, la souche LG 12 est identifiée comme appartenant à *L. donovani* ; et en plus cette souche est proche de LG 11, caractérisée comme étant *L. archibaldi* (Quispe *et al.*, 2004).

Nos résultats supportent l'hypothèse décrite par différents auteurs (Pratlong *et al.*, 1999 ; Hide *et al.*, 2001.) : *L. donovani* serait plus ancien que *L. infantum*, et parmi celle-ci, MON-1 aurait récemment envahi le pourtour méditerranéen.

Il est important de dire que pour l'ensemble des PCR nécessaire aux restrictions, le volume d'ADN à ajouter avant l'amplification a été estimé qualitativement à partir de l'intensité révélée aux U.V. des produits PCR précédents. Il serait donc judicieux de refaire l'ensemble de ces PCR-RFLP avec des concentrations quantifiées et standardisées d'ADN pour la totalité des souches.

3. PCR-RFLP au niveau du kDNA

Le projet de génotypage de *Leishmania* impliquant d'autres centres de recherche dans toute l'Europe, les 25 souches espagnoles que nous avons analysées ici ont aussi été étudiées par d'autres équipes utilisant d'autres marqueurs moléculaires. Nous avons reçu les résultats de l'équipe espagnole (de l'institut de médecine tropicale de Madrid), qui a travaillé sur ces souches au moyen d'une PCR-RFLP de l'ADN kinétoplastique par l'enzyme *Rsa I*. Il nous est paru intéressant de comparer les résultats obtenus avec ces deux marqueurs très différents, les

séquences nucléaires d'une part versus les séquences kinétoplastiques mitochondriales d'autre part.

Comme pour nos RFLP, les profils de restrictions ont été caractérisés par la présence ou l'absence de bandes, et transcrits sous forme d'une matrice disjonctive, qui nous a été envoyée.

L'arbre créé à partir de ces données de restrictions distingue 22 génotypes, regroupés en 4 clades, et présente une structure différente de notre arbre (voir Fig. 8).

Un point commun avec notre méthode d'analyse est la faiblesse des différentes branches. En effet, à l'exception des nœuds rassemblant des souches identiques ou très proches, les bootstrap sont faibles (en dessous de 50). Les caractères responsables de la structuration de l'arbre sont, ici encore, peu nombreux.

Il n'y a pas de structuration des souches dans l'arbre en fonction de l'hôte ou de leur origine géographique (Voir table 2). Cependant, contrairement à l'analyse des loci de la GP63 et de la CPB, un clade entier (la B) est constitué de souches en provenance de patients humains séropositifs. La restriction du kDNA ne permet pas de différencier les souches 4 et 5 ; ainsi que les souches 11 et 12, ces dernières distinguées par l'analyse des séquences codantes et non codantes d'antigènes.

Le différent pouvoir résolutif des différents marqueurs s'illustre également, mais dans l'autre sens, pour les souches 22 et 24 : l'analyse CPB/GP63 montrait une identité entre ces souches, alors que la restriction du kDNA sépare ces deux souches, mais regroupe ensemble les souches 21 et 22, ainsi que 24 et 25.

4. RAPD.

A. présentation et justification du choix de la technique.

La RAPD a déjà été utilisée comme marqueur de typage fin au sein de *L. infantum* (Hide *et al.*, 2001 ; A. Toledo *et al.*, 2002). Elle a permis, entre autre, la distinction de plusieurs souches françaises appartenant au zymodème MON-1 (Hide *et al.*, 2001). Cette technique paraît a priori tout à fait appropriée pour l'analyse du polymorphisme de nos souches espagnoles du zymodème MON-1.

Cette technique présente en plus l'avantage de pouvoir différencier des souches sans avoir besoin de connaître au préalable la séquence nucléotidique, et elle ne nécessite pas de nombreuses manipulations après l'amplification : les produits PCR sont directement analysés par leur migration sur gel d'agarose.

Par contre, elle présente une grande sensibilité aux diverses conditions expérimentales et une reproductibilité limitée (Black, 1993 ; Zemanova *et al.*, 2004).

B. Premières configurations et expérimentations.

Connaissant la faible stringence de la RAPD, en raison de la composante aléatoire de cette technique (utilisation d'une petite amorce décamerique, amplification à partir d'une hybridation plus moins spécifique sur la séquence cible) nous avons spécifié les obligations à suivre pour l'ensemble des amplifications à venir : utilisation d'un même lot de réactifs, travail en pièce blanche et amplifications toutes réalisées sur une seule et même machine.

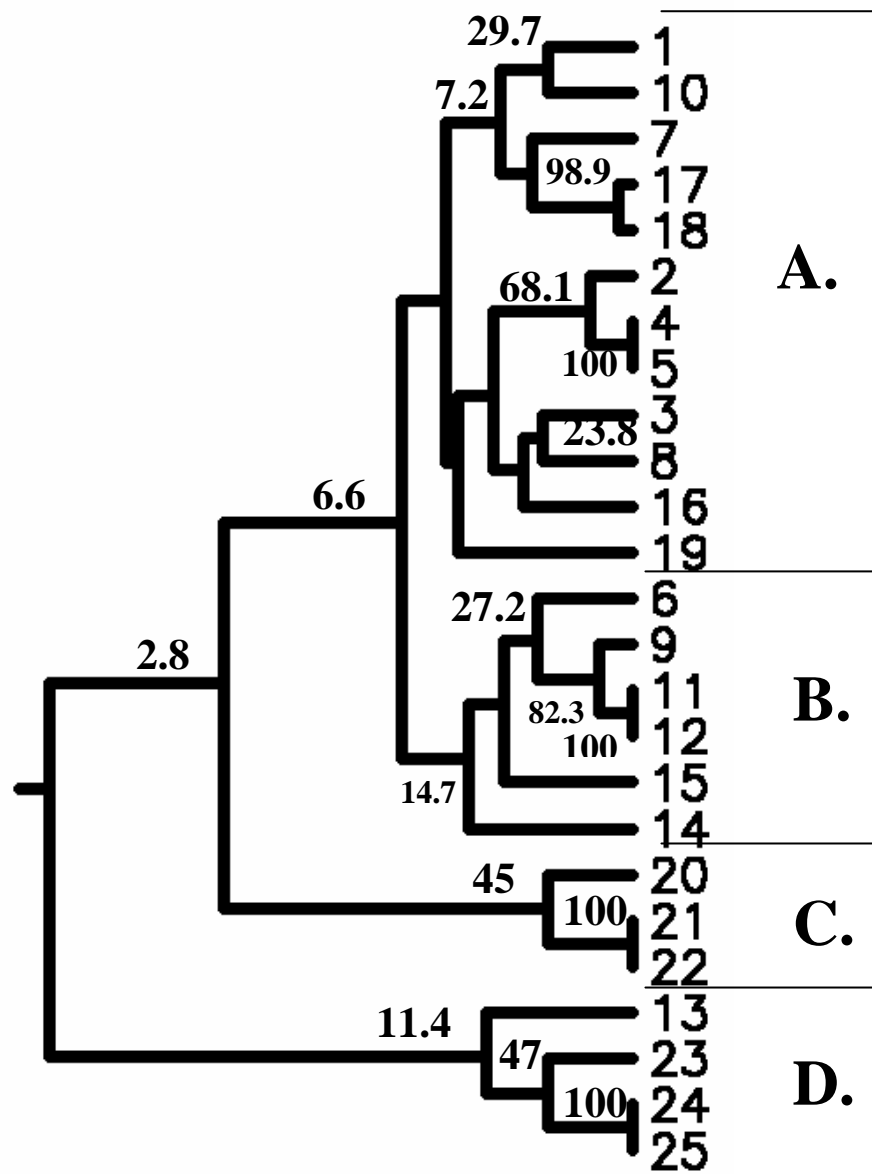


Fig. 8 : phénogramme obtenu par la restriction du kDNA avec l'endonucléase *Rsa I*.

Table 2. Arbre kDNA : décomposition des clades observés.

	A	B	C	D
Souches observées	1, 2, 3, 4, 5, 7, 8, 10, 16, 17, 18, 19 (12 souches)	6, 9, 11, 12, 14, 15 (6 souches)	20, 21, 22 (3 souches)	13, 23, 24, 25 (4 souches)
Origine géographique	Madrid : 8 souches (1, 2, 3, 4, 5, 7, 8, 10) Majorque : 4 souches (16, 17, 18, 19)	Madrid : 2 souches (6, 9) Majorque : 4 souches (11, 12, 14, 15)	Ibiza	Majorque : 1 souche (13) Ibiza : 3 souches (23, 24, 25)
Hôte	Humain : 6 souches (1, 2, 3, 4, 5, 16) Canin : 6 souches (7, 8, 10, 17, 18, 19)	Humain : 5 souches (6, 11, 12, 14, 15) Canin : 1 souche (9)	Canin	Humain : 1 souche (13) Canin : 3 souches (23, 24, 25)
Forme clinique (Parmi les hôtes humains)	VL	VL : 4 souches (6, 11, 12, 14) CL : 1 souche (15)		VL : 1 souche (13)
Coinfection HIV (Parmi les hôtes humains)	HIV+ : 3 souches (2, 4, 5) HIV- : 2 souches (1, 3) Inconnu : 1 souche (16)	HIV+		HIV+ : 1 souche (13)
Prélèvement des parasites	Moelle osseuse : 11 souches (1, 2, 4, 5, 7, 8, 10, 17, 18, 19) Ganglions : 1 souche (3)	Moelle osseuse : 5 souches (6, 9, 11, 12, 14) Peau : 1 souche (15)	Moelle osseuse : 2 souches (21, 22) Ganglions : 1 souche (20)	Moelle osseuse : 2 souches (13, 25) Ganglions : 2 souches (23, 34)

Pour commencer, nous avons réalisé une première série d'amplifications de l'ADN génomique des 25 souches espagnoles au moyen des 6 amorces RAPD. Dans cette première série de résultats, du polymorphisme plus ou moins conséquent avec chaque amorce utilisée fut trouvé.

Cependant, dès le début de la deuxième série d'amplifications sensées vérifier la reproductibilité de la méthode, des problèmes de non-reproductibilité et de contamination sont apparus.

C. Recherche des solutions

Les problèmes au niveau de la reproductibilité ont pu être supprimés ou atténués par la mesure de la concentration en ADN et l'uniformisation des dilutions d'ADN utilisées pour les mélanges de réaction à une concentration de 10ng/μl, ainsi que le travail en triplicats.

De multiples amplifications ont été faites sous différentes conditions, dans l'espoir de supprimer la contamination (utilisation de nouveaux réactifs, préparation des mélanges sous hotte, tubes eppendorf passés à l'autoclave, micropipettes et tips laissés sous U.V. toute une nuit, utilisation de plusieurs polymérases différentes). Mais tout cela n'eut aucun effet : une bande, dont la taille variait d'une amplification à l'autre, était toujours présente chez le contrôle négatif.

Plusieurs tests au niveau des amorces nous ont appris que la présence de la contamination dépendait en partie de l'amorce utilisée (les contrôles négatifs avec l'amorce B10 sont presque toujours contaminés, alors que ceux avec les amorces U2 ou R15 présentent des produits d'amplification étrangers beaucoup moins souvent). Le séquençage d'un contrôle négatif contaminé nous a appris que l'ADN contaminant était de l'ADN génomique d'origine humaine (alors qu'on pensait que la contamination pouvait provenir d'une mauvaise purification de la polymérase). Il s'agit probablement d'ADN aérosol se déposant dans les tubes lors de la préparation des mélanges de réaction. La RAPD étant une amplification aléatoire suite à l'hybridation plus ou moins spécifique d'une amorce décamerique, il est normal que cette technique ait été plus sensible à la contamination que les PCR-RFLP (qui amplifient des séquences spécifiques de l'ADN génomique de *Leishmania*)

De plus, une RAPD avec un gradient de concentration en ADN génomique nous a montré que l'ADN contaminant n'interfère pas avec l'ADN génomique quand celui-ci est présent en de grandes quantités dans le milieu : 20 ng (voir Fig. 9). Les produits majeurs d'amplification avec cette quantité d'ADN sont reproductibles. Les bandes présentes seulement dans une partie des répliquats pour un échantillon n'apparaissent que lorsque la RAPD est réalisée avec de l'ADN génomique dilué (J. Williams *et al.*, 1993). C'est également à de faibles concentrations en ADN génomique qu'une compétition pour l'amorce peut se produire entre l'ADN génomique leishmanien et l'ADN génomique humain contaminant. On peut dire qu'il y a un effet de titrage de l'amorce par l'ADN génomique leishmanien, peut-être en raison de meilleures hybridations avec l'amorce (J. Williams *et al.*, 1993).

D. Nouvelles mises au point.

Ces nouvelles données en main, nous avons mis au point une nouvelle marche à suivre pour les amplifications RAPD et l'analyse de ces produits d'amplification : aux conditions initiales d'amplification, nous avons ajouté le travail en triplicats pour toutes les amplifications de toutes les souches, et l'ajout d'un volume d'ADN quantifié et standardisé.

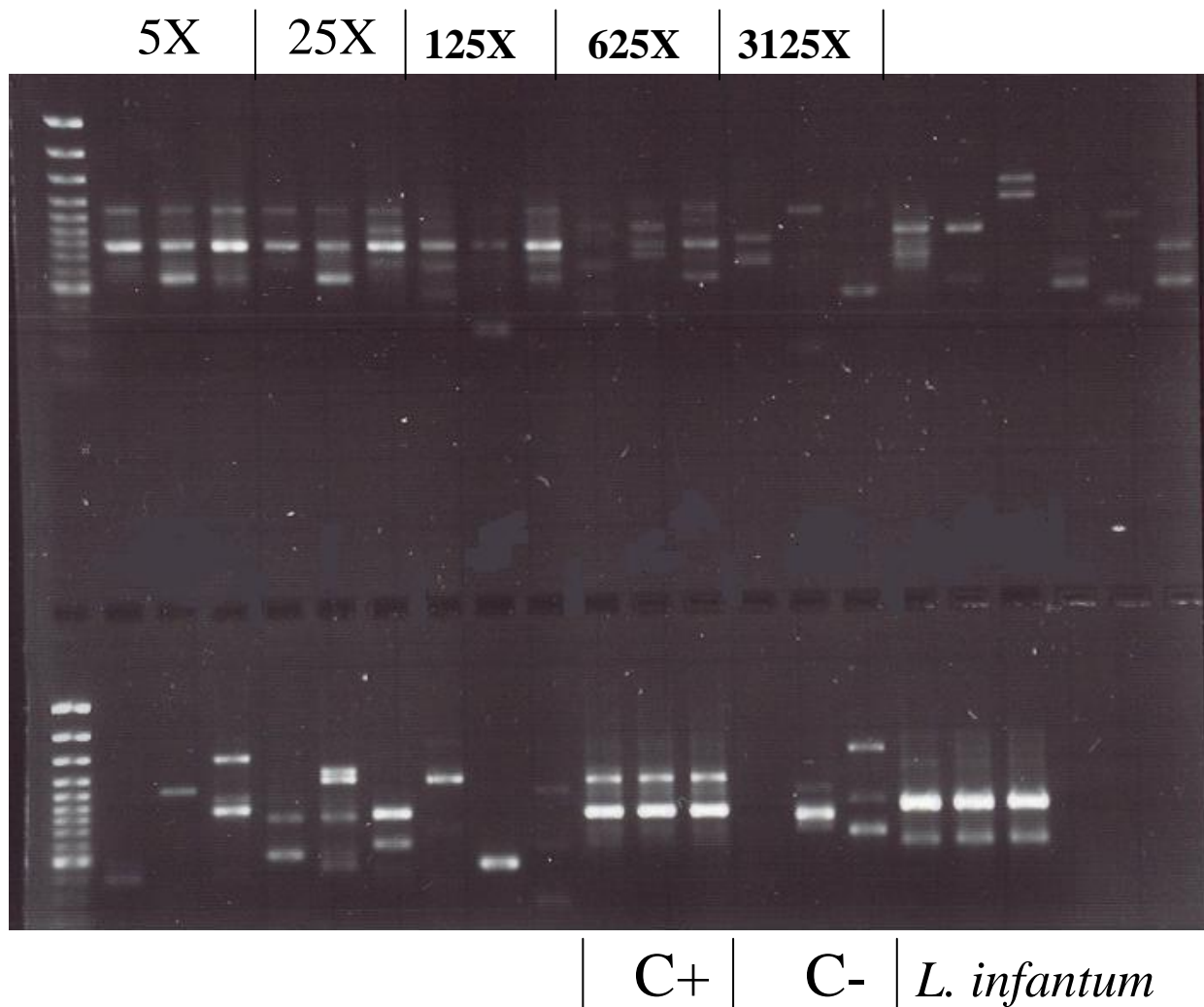


Fig. 9 : Amplification RAPD avec l'amorce B10 et un gradient de concentration d'ADN génomique de *L. braziliensis*. La reproductibilité disparaît dès la première dilution d'ADN génomique et les amplifications deviennent complètement aléatoires à la dilution 625X. Par contre, aux bonnes concentration, la distinction entre les espèces (ici, *L. braziliensis* et *L. infantum*) est aisée.

C+ : amplification réalisée avec de l'ADN de *L. braziliensis* non dilué.

C- : amplification réalisée sans ajout d'ADN génomique.

Comme la RAPD est réalisée avec des amorces courtes, ce qui diminue la spécificité de la PCR, et des conditions permissives, il existe un risque que certaines bandes ne soient pas amplifiées systématiquement dans tous les réplicats réalisés avec le même échantillon. Pour éviter de confondre la variabilité existant entre les différents réplicats, qui résulte de la faible stringence de la technique avec la variabilité génotypique qui pourrait exister entre les différentes souches testées, nous n'avons compté que les bandes présentes dans chaque réplicat obtenu avec un même échantillon.

Pour être sûr que les résultats soient comparables si par exemple, pour des raisons techniques, l'amplification de l'ensemble des triplicats doit se faire en deux temps, il serait alors judicieux de préparer un mix commun pour tous les tubes à amplifier, de réaliser une PCR pour la première série tandis que le mix restant pour la deuxième série de tube resterait stocké à -20°C en attente de la deuxième PCR ; plutôt que de préparer un mix de réaction pour chaque amplification, où peut se produire un changement minime involontaire dans la préparation, qui donnerait des résultats différents pour les deux séries d'amplification d'une même amorce RAPD, et serait faussement interprété comme du polymorphisme. On serait ainsi certains que la composition des mélanges de réaction est identique pour absolument tous les tubes, puisque les aliquots viendraient tous d'une même solution mère.

E. Résultats.

Parmi les 6 amorces utilisées, A1, B4, B10 et R15 donnent des résultats monomorphiques, F10 présente un léger polymorphisme (une bande supplémentaire apparaît dans une seule souche), et U2 est l'amorce qui montre le plus de polymorphisme : 4 génotypes différents ont pu être observés (seules les bandes présentes dans les trois exemplaires d'un triplicat furent comptabilisées).

Un arbre phénétique fut également construit avec les données RAPD. En raison du faible nombre d'amorces ayant donné du polymorphisme et du petit nombre de génotypes différents trouvés, l'arbre se résume à 4 branches contenant respectivement, 1, 2 et 21 souches (Voir Fig.10). Comme le programme a rassemblé les souches sur la base d'une ou deux différences seulement, les groupes sont extrêmement fragiles, et les bootstrap très faibles (valeurs souvent inférieures à 1%). Comme pour la PCR-RFLP, ces faibles valeurs sont dues au manque de caractères discriminant les différentes souches, auquel s'ajoute ici le faible nombre de caractères considérés pour la fabrication de la matrice.

Une autre méthode d'analyse qui aurait permis une observation plus fine des résultats, c'est-à-dire d'observer des bandes de plus faible intensité dans les réplicats, a été envisagée. Il s'agissait d'utiliser le Bioanalyzer pour la migration et l'observation des produits d'amplifications RAPD. Mais cette idée a été abandonnée en raison du grand nombre d'échantillons à traiter (81 par amorces, 6 amorces à analyser), donc du temps et du coût nécessaire à la réalisation de cette analyse.

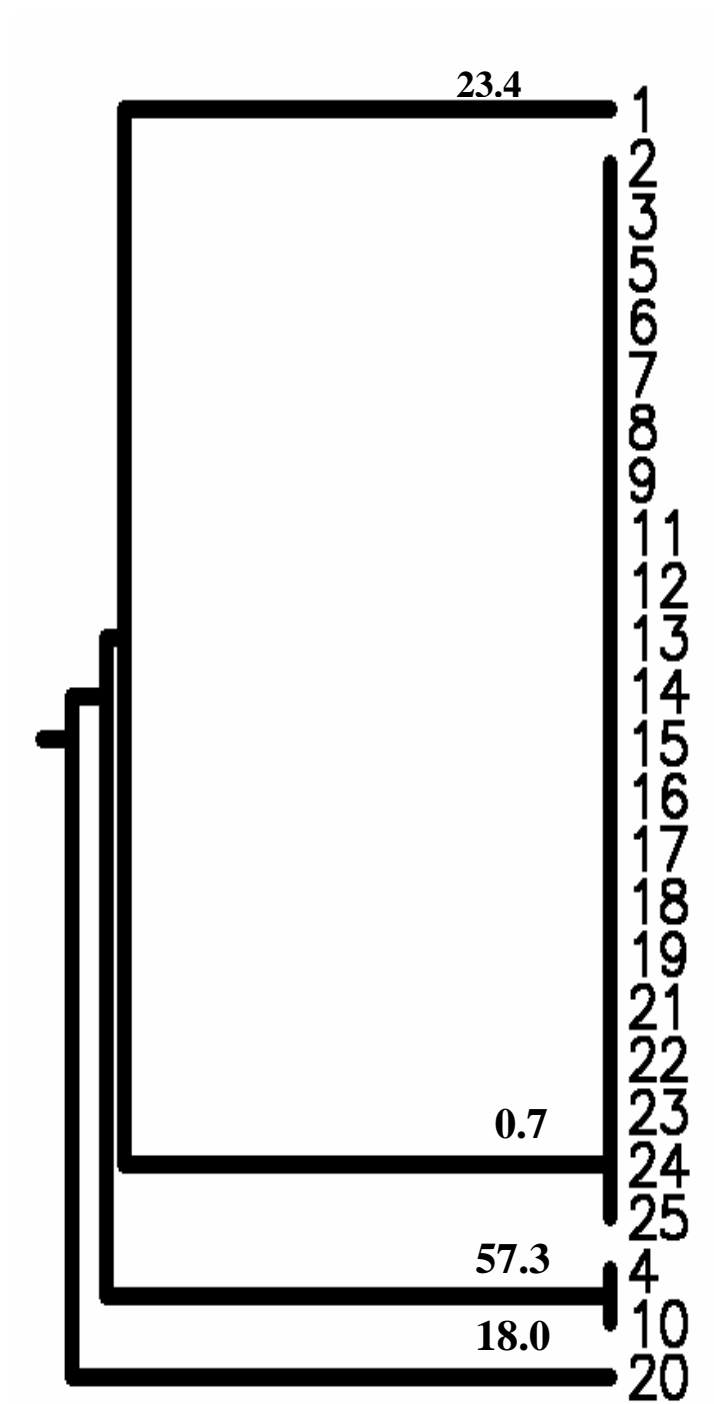


Fig. 10 : Structure de l'arbre obtenu avec les amplifications RAPD.

5. Polymorphisme total.

En combinant les données de l'analyse des loci de la GP63 et de la CPB réalisée à Anvers avec celles de la restriction du kDNA, faite à Madrid, on obtient un arbre global, montrant 24 génotypes différents sur les 25 souches étudiées (Voir Fig. 11) (Les données issues de la RAPD n'ont pas été utilisées ici, en raison du faible polymorphisme trouvé avec cette méthode).

Les bootstrap sont ici très variables : les nœuds aux extrémités de l'arbre sont plutôt forts pour les petits groupes (des valeurs proches de 100% pour les souches identiques ou presque). Mais les nœuds en amont, comme ceux séparants les clades, sont beaucoup plus faibles, plus fragiles (de 1 à 75%).

La combinaison des données de l'analyse au niveau de l'ADN génomique avec celle de l'ADN kinétoplastique permettent d'afficher des résultats n'apparaissant pas quand les techniques sont utilisées séparément.

La répartition des souches sur l'arbre est semblable à celle vue avec l'arbre des PCR-RFLP, à quelques détails près : les souches 1 et 6 sont ici complètement séparées, et ce dès les premières branches de l'arbre, ils forment maintenant deux singletons. Les souches prélevées à Ibiza (20 à 25) sont maintenant toutes présentes dans le clade C. De plus, pour ces 6 souches chaque arbre montrait une ou deux paires identiques ; ici toutes les souches sont individualisées dans un sous-groupe, mais celles regroupées par l'analyse du kDNA (21+22 et 24+25) restent très proches l'une de l'autre. On peut également voir que les souches de Madrid sont concentrées dans le clade A, mais sont néanmoins présentes dans toutes les le clade B et en dehors des singletons contrairement aux souches des autres origines géographiques (voir table 4) : les souches de Majorque sont réparties uniquement dans les clades A et B ; et comme précisé plus haut, les souches d'Ibiza sont maintenant concentrées dans une seule clade (C).

Mis à part le rassemblement de souches d'Ibiza dans une clade comptant une majorité de souches insulaires et la majorité des souches Madrilènes groupées dans l'autre grande clade, il ne semble pas y avoir de relation entre l'arborescence et les différentes caractéristiques des souches étudiées (hôte, clinique, coinfection avec le VIH).

Le fait que le plus large polymorphisme ait été trouvé pour les souches Madrilènes peut s'expliquer aussi bien par une convergence des hôtes des différentes souches de parasites dans ce milieu urbain, zone d'échanges économiques et culturels. Cependant, le haut niveau de polymorphisme trouvé dans les souches de la capitale peut aussi s'expliquer par un effet fondateur de Madrid : dans cette théorie, Madrid ne serait pas le point de rassemblement des souches hispaniques de *Leishmania*, mais l'épicentre, le foyer de la dissémination des parasites vers l'ensemble du pays. Dans ce modèle, cette zone initiale est également celle présentant le plus de polymorphisme dans la population de parasites, en raison d'une plus grande diversité génétique initiale. Nos résultats suggèrent une plus grande proximité épidémiologique entre les foyers de Madrid et de Majorque, alors qu'Ibiza semble s'individualiser. Cette distinction géographique doit néanmoins être vérifiée, compte tenu du petit nombre de souches dont nous disposons actuellement et surtout du fait que l'ensemble des souches prélevées à Ibiza sont d'origine canine. Il faudrait vérifier si les souches d'Ibiza s'individualisent encore avec cette fois des souches prélevées chez des hôtes humains.

La combinaison des données permet aussi de préciser la nature des souches 4/5 et 11/12. On ne trouve aucune autre souche présentant le même génotype dans notre échantillon. L'hypothèse de la rechute paraît donc la plus plausible, ce qui est logique chez des patients immunodéprimés, connus comme étant difficiles à traiter.

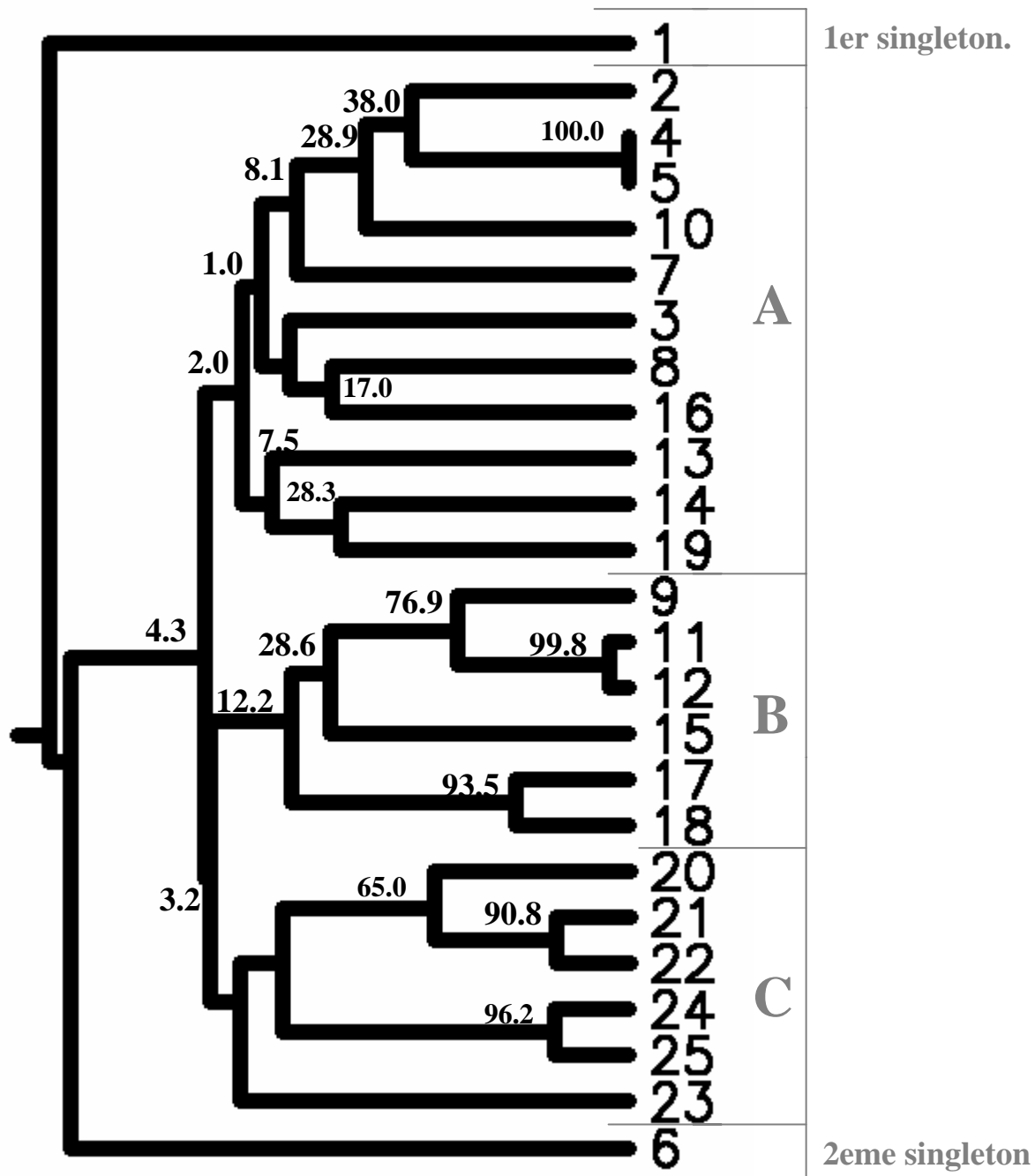


Fig. 11. Structure de l'arbre global, obtenu avec les données combinées des restrictions au niveau du kDNA et des séquences CPB et GP63.

Table 3. Arbre global : décomposition des clades observés.

	1 ^{er} singleton	A	B	C	2 ^{eme} singleton
Souches observées	1 (1 souche)	2, 3, 4, 5, 7, 8, 10, 13, 14, 16, 19. (11 souches)	9, 11, 12, 15, 17, 18, (6 souches)	20, 21, 22, 23, 24, 25 (6 souches)	6 (1 souche)
Origine géographique	Madrid	Madrid : 7 souches. (2, 3, 4, 5, 7, 8, 10) Majorque : 4 souches. (13, 14, 16, 19)	Madrid : 1 souche (9) Majorque : 5 souches (11, 12, 15, 17, 18)	Ibiza	Madrid
Hôte	Humain	Humain : 7 souches. (2, 3, 4, 5, 13, 14, 16) Canin : 4 souches. (7, 8, 10, 19)	Humain : 3 souches. (11, 12, 15) Canin : 3 souches. (17, 18, 19)	Canin	Humain
Forme clinique (Parmi les hôtes humains)	L.V.	LV : 7 souches. (2, 3, 4, 5, 13, 14, 16)	LV : 2 souches. (11, 12) LC : 1 souche. (15)		L.V.
Coinfection HIV (Parmi les hôtes humains)	HIV-	HIV+ : 5 souches. (2, 4, 5, 13, 14) HIV- : 1 souche. (3) Inconnu : 1 souche. (16)	HIV+ : 3 souches. (11, 12, 15)		HIV+
Prélèvement des parasites	Moelle osseuse	Moelle osseuse : 11 souches. (2, 3, 4, 5, 8, 10, 13, 14, 16, 19) Ganglions : 1 souche. (7)	Moelle osseuse : 5 souches. (9, 11, 12, 17, 18) Peau : 1 souche. (15)	Moelle osseuse : 3 souches. (21, 22, 25) Ganglions lymphatiques : 3 souches. (20, 23, 24)	Moelle osseuse

IV

**Conclusions
et
perspectives**

Notre objectif était de caractériser le polymorphisme de 25 souches espagnoles de *L. infantum* zymodème MON-1 au moyen de PCR-RFLP effectuée au niveau de séquences codantes des antigènes majeurs de *Leishmania*, ainsi que des régions intergéniques.

-Polymorphisme observé avec les marqueurs PCR-RFLP GP63/CPB.

L'analyse par ces PCR-RFLP révèle un polymorphisme conséquent : 22 génotypes ont pu être identifiés parmi les 25 souches regroupés en 3 clades majeurs. Cependant, cette structuration reste assez peu robuste en raison du petit nombre de caractères permettant la discrimination de ces clades. Ceci ne veut pas dire que les caractères sont artéfactuels.

Il faut garder à l'esprit que nous avons travaillé avec une série de souches de la même espèce, du même zymodème et prélevées dans des zones géographiques proches. L'analyse de loci complémentaires devrait donc permettre de confirmer cette structuration.

-Polymorphisme observé avec le marqueur PCR-RFLP kDNA.

Ceci a été entamé ici, par l'analyse de ces mêmes souches par la restriction du kDNA. Nous avons observé une structure différente et un pouvoir de résolution à peine plus faible : 4 clades très peu robustes dans lesquelles se distinguent 21 génotypes. Comme dans le cas des restrictions aux niveaux des séquences de la GP63 et de la CPB ; les séquences analysées sont trop proches que pour avoir de nombreux caractères variables d'une souche à l'autre.

-Comparaison entre les deux types de marqueurs.

Les différences entre la structuration observée d'une part par la restriction de séquences codantes et non codante des gènes de la GP63 et de la CPB, et d'autre part par la restriction de l'ADN kinétoplastique proviennent probablement des différences intrinsèques aux séquences nucléotidiques ciblées par chacun de ces deux marqueurs, à savoir : l'ADN génomique et l'ADN kinétoplastique.

En effet, ces deux types d'ADN présents chez *Leishmania* diffèrent par de nombreuses caractéristiques : la localisation, la structure, le mode de transmission aux cellules filles, les fonctions pour lesquelles ils codent.

En plus d'être situés et structurés différemment, ces deux types d'ADN codent pour des fonctions différentes ; l'ADN génomique, contient, entre autres, les gènes codant pour les antigènes, les facteurs de virulence, tels que la GP63 ou la CPB. Ces séquences codantes sont soumises à une pression de sélection par le système immunitaire, seuls les parasites les mieux adaptés à la pression immune, parviendront à se développer. Par contre, L'ADN kinétoplastique est impliqué dans les tâches ménagères (housekeeping) de la cellule, et donc soumis à une pression de sélection différente.

Il est à noter que dans notre travail, se sont les séquences intergéniques (IGS) de gènes d'antigènes qui se sont montrées les plus variables ; on ne peut donc pas parler de variation antigéniques dans notre échantillon.

De plus, ces deux types d'ADN ne se transmettent pas à la descendance de manières similaires. Lors de la division cellulaire, l'ADN génomique est ségrégué de manière égale. Par contre, les mini- cercles du kDNA constituent une population de séquences nucléotidiques transmises aléatoirement et dans une proportion variable à chaque cellule fille. On peut rapidement assister à une sorte de dérive génique.

On est maintenant en droit de se poser la question : parmi ces deux marqueurs, lequel est le plus approprié, lequel donne la meilleure structuration dans une recherche épidémiologique ? L'idée générale étant que plus on a de caractères, mieux c'est pour le fingerprinting, nous dirions que la meilleure structuration de l'échantillon observée est obtenue par la combinaison des deux marqueurs. En effet, en plus d'augmenter le nombre de caractères étudiés, le rassemblement des données obtenues par les deux marqueurs a un effet d'additivité, de nouvelles observations peuvent être faites. Ces observations concernent le degré de similarité entre les souches, l'organisation interne de l'arbre, la robustesse des clades observées par l'augmentation des caractères discriminants.

-Polymorphisme observé avec le marqueur RAPD.

Parallèlement, nous avons testé sur les souches une troisième méthode, à savoir l'amplification aléatoire RAPD.

Force est de constater que cette technique est moins discriminante que les RFLP, 4 génotypes seulement ont été identifiés. Cette faible puissance vient de la faible reproductibilité de la technique, du petit nombre d'amorces montrant du polymorphisme parmi l'ensemble testé.

Bref, les résultats obtenus posent quelques questions sur la reproductibilité de la RAPD et l'intérêt de son utilisation en tant que marqueur de génotypage fin, développé pour mettre en évidence des DTUs. La RAPD semble inadaptée pour le typage fin, comme ici chez des souches appartenant à un même zymodème, alors qu'elle semble être un bon marqueur à un niveau taxonomique supérieur, par exemple pour la discrimination d'espèces. (I. Guizani *et al.*, 2002 ; E. Martinez *et al.*, 2003 ; E. Zemanova *et al.*, 2004)

-Polymorphisme inter- et intraspécifique observé avec le marqueur PCR-RFLP GP63/CPB.

Par contre, quand nos résultats ont été comparés à ceux obtenus avec le même marqueur pour des souches taxonomiquement plus éloignées ; le nombre de caractères discriminants augmentant avec l'éloignement taxonomique entre deux souches, nous avons obtenu un arbre dont la structure est plus robuste au niveau de nœuds discriminants des souches préalablement connues comme étant différentes (d'espèce ou de zymodème). Les faibles bootstrap observées avec notre échantillon seul sont donc bien dues à une faible variabilité au sein du zymodème MON-1, et le marqueur utilisé est donc bien efficace pour le typage fin.

-Perspectives.

Dans l'avenir, on pourrait améliorer les résultats obtenus avec la PCR-RFLP de l'ADN génomique en utilisant des concentrations d'ADN standardisées et constantes, ainsi que tester ce marqueur sur une plus grande quantité de souches (pourquoi pas couplée avec l'analyse par la restriction du kDNA), par exemple dans le cadre d'une étude épidémiologique sur un petit milieu fermé, une île par exemple. D'autres séquences nucléaires pourraient être analysées.

On pourrait également continuer l'approche avec la RAPD, en ne l'utilisant pas comme marqueur en tant que tel, comme nous avons fait, mais plutôt serait en tant qu'outil de prospection du génome, afin de chercher d'autres marqueurs plus spécifiques et plus fiables : les bandes apparaissant spécifiquement dans une souche ou l'autre après une amplification RAPD pourraient être séquencées pour rechercher la spécificité de cette bande, et ainsi

développer par exemple un protocole PCR ne mettant en évidence que cette séquence chez la souche qui l'a montrée initialement.

Il est également envisageable de développer d'autres types de marqueurs moléculaires, tels que les microsatellites, qui pourraient être utilisés pour une étude plus phylogénétique de ces souches. Par exemple une répétition du dinucléotide « AC », qui avait été localisée au niveau de la séquence intergénique de la β -tubuline. Cette séquence était répétée 11 ou 12 fois dans les séquences alignées, venant de LG 2 (*L. infantum*, MON-1), LG 13 (*L. donovani*, MON-42) et LG 16 (*L. donovani*, MON-38) : $(AC)_6$ CG $(AC)_5$ ou 6.

Mais l'étude de ce marqueur ne fut pas poussée plus loin, car les alignements réalisés par le labo ne montraient pas une grande variabilité dans la taille de cette répétition, il s'agissait plutôt d'un déplacement du dinucléotide GC dans les répétitions de AC. Cependant, il est envisageable de poursuivre le développement de cette méthode, du polymorphisme au sein de MON-1 ayant déjà pu être observé au moyen de marqueurs microsatellites (Bulle *et al.*, 2002)

v

Bibliographie

- Alvar, J., Canavate, C., Gutierrez-Solar, B., Jimenez, M., Laguna, F., Lopez-velez, R., Molina, R. & Moreno, J. Leishmania and Human Immunodeficiency Virus coinfection : the first 10 years. *Clinical Microbiology Reviews* **10**, 298-319 (1997).
- Bañuls, A. L., Hide, M., & Tibayrenc, M. Molecular epidemiology and evolutionary genetics of *Leishmania* parasites. *International journal for Parasitology* **29**, 1137-1147 (1999).
- Black, W.C. PCR with arbitrary primers: approach with care. *Insect Molecular Biology* **2**(1), 1-6 (1993).
- Brisse, S. Phylogénie moléculaire des clones naturels de *Trypanosoma cruzi*, agent de la maladie de Chagas : évolution clonale, recombinaison génétique, et relations phylogénétiques avec d'autres espèces du genre *Schizotrypanum* (1997). Thèse de doctorat, université de Montpellier II.
- Bulle, B., Millon, L., Bart, J-M., Gallego, M., Gambarelli, F., Portus, M., Schnur, L., Jaffe, C.M., Fernandez-Barredo, S., Alunda, J.M. & Piarroux, R. Practical approach for typing strains of *Leishmania infantum* by microsatellite analysis. *Journal of Clinical Microbiology* **40**, 3391-3397 (2002).
- Buxbaum, L.U., Denise, H., Coombs, G.H., Alexander, J., Mottram, J.C. & Scott, P. Cystein Protease B of *Leishmania mexicana* inhibits host Th1 responses and protective immunity *The journal of immunology* **171**, 3711-3717 (2003).
- Campino, L.M. Canine reservoir and leishmaniasis : epidemiology and disease. Dans World class parasites Vol 4 : *Leishmania*, Kluwer Academic Publisher (2002).
- Chang, K.P. and Chaudhri, G. Molecular determinants of *Leishmania virulence* *Annu. Rev. Microbiol.* **44**, 499-529 (1990).
- Chicharro, C., Jimenez, M. I. & Alvar, J. Iso-enzymatic variability of *Leishmania infantum* in Spain. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology* **97**, 57-64 (2002).
- Chicharro, C., Moralès, M.A., Serra, T., Arès, M., Salas, A., & Alvar, J. Molecular epidemiology of *Leishmania infantum* on the island of Majorca : a comparison of phenotypic and genotypic tools. *Transactions of the royal society of tropical medicine and hygiene* **96**, supplement 1 S1/93-S1/99 (2002).
- de Almedia, M.C., Vilhena, V., Barral, A. & Barral-Netto, M. Leishmanial infection : Analysis of its first steps. A Review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **98**, 861-870 (2003).
- De la Loma, A., Alvar, J., Martinez Galiano, E., Blazquez, J., Alcala Munoz & A., Najera, R. Leishmaniasis or AIDS ? *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **79**, 421-422 (1985).
- Desjeux, P. Aspect de santé publique et de lutte. Dans *Les Leishmanioses*. Coll. Méd. Tropicale, Ellipse (1999).
- Desjeux, P. and Alvar, J. *Leishmania*/HIV co-infections : epidemiology in Europe. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* **97**, S3-S15 (2002).

- Guerbouj, S., Victoir, K., Guizani, I., Seridi, N., Nuwayri-Salti, N., Belkaid, M., Ben Ismail, R., Le Ray, D., & Dujardin, J. C. Gp63 gene polymorphism and population structure of *Leishmania donovani* complex influence of the host selection pressure? *Parasitology* **122**, 25-35 (2001).
- Guizani, I., Dellagi, K., & Ben Ismaïl, R. Random Amplified Polymorphic DNA technique for identification and differentiation of old world *Leishmania* species. *Ann. J. Trop. Med. Hyg.* **66**, 152-156 (2002).
- Hide, M., Bañuls, A. L. & Tibayrenc, M. Genetic heterogeneity and phylogenetic status of *Leishmania (Leishmania) infantum* Zymodeme MON-1: epidemiological implications. *Parasitology* **123**, 425-432 (2001).
- Killick-Kendrick, R. Phlebotomine sand flies : Biology and control. Dans World class parasites Vol 4 : *Leishmania*, Kluwer Academic Publisher (2002).
- Lainson, R. and Shaw, J.J. The genus *Leishmania* Ross, 1903. Dans *Leishmania: Taxonomie et Phylogénese*, 1986
- Martinez, E., Alonso, V., Quispe, A., Thomas, M.C., Alonso, R., Piñero, J.E., Gonzales, A.C., Ortega, A. & Valladares, B. RAPD method useful for distinguish *Leishmania* species : design of specific primer for *L. Braziliensis*. *Parasitology* **127**, 513-517 (2003).
- Masatoshi, N. and Wen-Hstung, L. Mathematical model for studying genetic variation in term of restriction endonucleases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 5269-5273 (1979).
- Mauricio, I. L., Howard, M. K., Stothard, J. R. & Miles, M.A. Genomic diversity in the *Leishmania donovani* complex. *Parasitology* **119**, 237-246 (1999).
- Mauricio, I. L., Gaunt, M. W., Stothard, J. R. & Miles, M. A. Genetic typing and phylogeny of the *Leishmania donovani* complex by restriction analysis of PCR amplified Gp63 intergenic regions. *Parasitology* **122**, 393-403 (2001).
- Mauricio, I.L., Stothard, J.R., & Miles, M.A. The strange case of *Leishmania chagasi*. *Parasitology Today* **16**, 188-189 (2000).
- Melhorn, H. Encyclopedic reference of Parasitology. Biology-Structure-Function. 2nd ed Springer (2001).
- Morales, S. A., Chicharro, C., Ares, M., Canavate, C., Barker, D. C. & Alvar, J. Molecular tracking of infections by *Leishmania infantum*. *Transactions of the royal society of tropical medicine and hygiene* **95**, 104-107 (2001).
- More, B., Bhatt, H., Kukreja, V. & Ainapure, S.S. Miltefosine: great expectations against visceral leishmaniasis. *J Postgrad Med* **49**, 101-103 (2003).

- Mundodi, V., Somanna, A., Farrel, P.J. & Gedamu, L. Genomic organization and functional expression of differentially regulated *cysteine protease* genes of *Leishmania donovani* complex. *Gene* **282**, 257-265 (2002).
- Peters, W. Taxonomy and phylogeny of *Leishmania*. Dans *Leishmania: Taxonomie et Phylogénese* (1986).
- Prasad, R., Kumar, R., Jaiswal, B.P. & Singh, U.K. Miltefosine: An oral drug for visceral leishmaniasis. *Indian J Pediatr* **71**, 143-144 (2004).
- Pratlong, F., Derreure, J., Bucheton, B., El-Safi, S., Dessein, A., Lanotte, G. & Dedet, J.P. Sudan: The possible Original Focus of Visceral Leishmaniasis. *Parasitology* **122**, 599-605 (2001).
- Quispe Tintaya, K.W., Xu, Y., Dedet, J.P., Rijal, S., De Bolle, X. & Dujardin, J.C. Antigen Genes for Molecular Epidemiology of Leishmaniasis : Polymorphism of Cystein Proteinase B and Surface Metalloprotease Glycoprotein 63 in the *Leishmania donovani* Complex. *Journal of infectious diseases* **189**, 1035-1043 (2004).
- Revillard, J.P., Immunologie, 4ème éd. De Boek université (2001).
- Rioux, J.A., Lanotte, G., Serres, E., Pratlong, F., Bastien, P., Perieres, J. Taxonomy of *Leishmania*. Use of isoenzymes. Suggestions for a new classification. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.* **65**, 111-125 (1990).
- Rosenthal, E. and Marty, P. Recent understanding in the treatment of visceral leishmaniasis. *J Postgrad Med* **49**, 61-68 (2003).
- Singh, S., Sivakumar, R. Recent advances in the diagnosis of leishmaniasis. *J. Postgrad Med* **49**, 55-60 (2003).
- Solander, R.K., Caugant, D.A., Ochman, H., Musser, J.M., Gilmour, M.N. & Whittam, T.H. Methods of multilocus enzyme electrophoresis for bacterial population genetics and systematics. *Applied and Environmental Microbiology* **51**, 873-884 (1986).
- Swofford, D.L., Olsen, G.J., Waddells, P.J. and Hillis, D.M. Phylogenetic inference, dans *Molecular systematics*, 2nd ed, Sinauer Associates (1996).
- Tibayrenc, M. Genetic epidemiology of parasitic protozoa and other infectious agents: the need for an integrated approach. *International journal of parasitology* **28**, 85-104 (1998)
- Tibayrenc, M. and Ayala, F.J. The clonal theory of parasitic protozoa: 12 years on. *TRENDS in parasitology* **18**, 405-410 (2002)
- Victoir, K. & Dujardin, J-C. How to succeed in parasitic life without sex ? Asking *Leishmania*. *TRENDS in Parasitology* **18**, 81-85 (2002).

Victoir, K., Bañuls, A.L., Arevalo, J.A., Llanos-Cuentas, A., Hamers, R., Noël, S., De Doncker, S., Le Ray, D., Tybayrenc, M., & Dujardin, J.C. The GP63 gene locus, a target for genetic characterisation of *Leishmania* belonging to sugenus *Viannia*. *Parasitology* **117**, 1-13 (1998).

Victoir, K., Genomic organisation and dynamics of the GP63 genes in *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* and *Leishmania* (*Viannia*) *peruviana* : functional and diagnostic implications (2001). Thèse de doctorat,

Williams, J.G.K., Hanafey, M.K., Rafalski, J.A. & Tingey, S.V. Genetic analysis using Random Amplified Polymorphic DNA. *Methods in enzymology* **218**, 704-740 (1993).

Zemanova, E., Jirku, M., Mauricio, I.L., Miles, M.A. & Lukes, J. Genetic polymorphism within the *Leishmania donovani* complex: correlation with geographic origin. *Annual Journal of Tropical Medecine and hygiene* 2004 (sous presse).